



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE**

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN:

BIOLOGIA MOLECOLARE APPLICATA

**CARATTERIZZAZIONE DI BIRRE ARTIGIANALI
DEFINITE PROBIOTICHE**

**CHARACTERIZATION OF PROBIOTIC
CRAFTBEER**

Studente:
SAMUELE BRUNOZZI

Relatore:
DOTT.SSA LAURA CANONICO

Correlatore:
DOTT.SSA ALICE AGARBATI

Sessione straordinaria Febbraio
Anno accademico 2021/2022

INDICE

CAPITOLO 1- INTRODUZIONE.....	5
1.1 LA BIRRA: LE MATEIRE PRIME.....	5
1.1.1 Acqua.....	5
1.1.2 Orzo.....	7
1.1.3 Luppolo.....	8
1.1.4 Lievito.....	9
1.2 PROCESSO PRODUTTIVO DELLA BIRRA.....	10
1.2.1 Maltazione.....	10
1.2.2 Ammostatura.....	11
1.2.3 Fermentazione.....	13
1.2.4 Downstream.....	14
1.3 BIRRE ARTIGIANALI.....	14
1.4 CEPPI LIEVITI NELLA PRODUZIONE DI BIRRA ARTIGIANALE.....	15
1.5 PRINCIPALI COMPOSTI AROMATICI.....	18
1.6 I MICRORGANISMI PROBIOTIVI.....	22
1.6.1 <i>Lactic Acid Bacteria (LAB) e Bifidobatteri.....</i>	<i>24</i>
1.6.2 <i>Saccharomyces cerevisiae e boulardii.....</i>	<i>25</i>
1.7 ALIMENTI FUNZIONALI E PROBIOTICI.....	28
1.7.1 Proprietà nutraceutiche	28
CAPITOLI 2 – SCOPO DELLA TESI.....	30
CAPITOLO 3– MATERIALE E METODI.....	31
3.1 BIRRE ANALIZZATE.....	31
3.2 TERRENI DI CULTURA.....	34
3.3 ANALISI CHIMICHE.....	36
3.3.1 Estrazione con tecnica PSME.....	36

3.3.2 Alcoli superiori.....	37
3.4 VALUTAZIONE CEPPI COME POSSIBILI PROBIOTICI....	38
3.4.1 Conta dei lieviti nelle birre analizzate.....	38
3.4.2 Vitalità e crescita a 37°C.....	40
3.4.3 Vitalità e crescita a 37°C, Sali biliari e pH 2.....	41
3.4.4 Attività antiossidante della matrice.....	42
CAPITOLO 4– RISULTATI	44
4.1 Isolamento lieviti nelle birre analizzate.....	44
4.2 Valutazione ceppi isolati come possibili probiotici.....	45
4.2.1 Test vitalità a 37°C.....	45
4.2.2 Test vitalità Sali biliari e pH 2.....	50
4.2.3 Saggio DPPH per attività antiossidante.....	56
4.3 Principali composti secondari.....	57
4.4 Principali composti volatili.....	58
CAPITOLO 5 – CONCLUSIONI.....	60

Capitolo 1- INTRODUZIONE

La birra è una delle bevande più consumate al mondo, ed il suo processo di produzione è rimasto pressoché invariato da tempi antichissimi: acqua, orzo e luppolo sono gli ingredienti principali. Ovviamente le tecniche di produzione si sono affinate nel corso degli anni per via dell'industrializzazione e della commercializzazione di questo prodotto in tutto il mondo, e soprattutto negli ultimi anni la birrificazione si è adattata alle richieste dei consumatori. Una di queste è sicuramente quella di avere degli alimenti più salutari. Per questo motivo, sempre più birrifici stanno mettendo sul mercato prodotti che siano non solo piacevoli e con caratteristiche sensoriali gradevoli al consumatore, ma che associano anche degli aspetti benefici per la salute.

1.1 LE MATERIE PRIME

1.1.1 ACQUA

La birra è formata dal 90-95% da acqua (*figura 1*), la sua composizione in termini di sali minerali, come cloro, magnesio e solfato può influenzare il processo produttivo ed il gusto finale della birra.

Le acque, infatti, sono classificate secondo il contenuto di sali minerali: molto dolci (bassa concentrazioni di Sali), dolci, dure e molto dure (alta concentrazione di sali). I sali minerali disciolti influenzano il valore di pH, legandosi agli H^+ o OH^- , i Sali minerali più presenti sono: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , HCO_3^- , Cl^- , SO_4^- .

Nella tabella 1, si riportano le concentrazioni di Sali minerali espresse in p.p.m, delle acque tipicamente utilizzate nella produzione di diversi stili di birra (Cabras et al., 2004).

Tabella 1. Concentrazione in ppm delle acque usate nella produzione delle seguenti birre

	Pilsen	Monaco	Dublino	Dortmund	Burton
Ca ²⁺	7	75	115	250	295
Mg ²⁺	2	20	4	25	45
Na ⁺	2	10	4	70	45
SO ₄ ⁻	5	10	55	280	725
HCO ₃ ⁻	15	200	200	550	300
Cl ⁻	5	2	19	100	25

le molecole presenti nell'acqua, in particolar modo gli ioni, possono influenzare notevolmente la performance degli altri ingredienti utilizzati nella produzione della birra, come lievito, malto e luppolo. Per quanto riguarda il lievito, gli ioni inorganici, come ad esempio Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Mg²⁺, K⁺ e Ca²⁺, svolgono un ruolo enzimatico e strutturale indispensabile, tanto che un'adeguata concentrazione di tali molecole comportano una crescita e una fermentazione ottimali (Stewart et all, 2009), oltre che una buona flocculazione, in particolar modo quest'ultima grazie alla presenza di ioni Ca²⁺. Al contrario ovviamente, un'eventuale scarsità di ioni può causare alterazioni del metabolismo e della crescita del lievito stesso. Ulteriori funzioni degli ioni inorganici sono: stimolare l'attività degli enzimi amilolitici e proteolitici durante la fase di ammostamento; migliorare la chiarificazione grazie all'influenza sull'interazione tra proteine, polifenoli e iso- α -acidi del luppolo; favorire la precipitazione delle proteine durante l'ebollizione; determinare il pH del mosto. In

merito a quest'ultimo aspetto, è importante sottolineare quanto il pH possa influenzare significativamente il processo produttivo della birra: un aumento infatti comporta una lenta idrolizzazione di amido e proteine, una filtrazione e una resa in estratto meno efficiente, una minore concentrazione di FAN (Free Amino Nitrogen) e azoto solubile ed estrazione di tannini e polifenoli dal malto con effetti negativi sulle caratteristiche organolettiche della birra, al contrario una diminuzione del pH aumenta la stabilità aromatica del prodotto e la resistenza alle contaminazioni microbiche.

1.1.2 ORZO

Il malto è un prodotto di origine vegetale, ottenuto dalla germinazione di cereali (orzo, frumento, segale, avena, sorgo, miglio, riso, mais) o pseudo-cereali (grano saraceno e quinoa). Tra questi, l'orzo (*Figura 2*) è il maggiormente utilizzato per la produzione della birra. Questo cereale è costituito da: carboidrati (70-85%), di cui il 55-56% di amido, utilizzato dai lieviti durante la fermentazione, cellulosa ed emicellulosa, fondamentali per la resistenza e rigidità del seme, e zuccheri semplici (glucosio, fruttosio e saccarosio); proteine (10,5-11,5%), quali gluteine, prolamine, globuline e albumine, essenziali per la produzione di schiuma ma causa di intorbidimenti se in eccesso; lipidi (1,5-2%), come trigliceridi, i quali esercitano un effetto negativo sulla schiuma; in piccola quantità vitamine (B1, B2, C, E) necessarie per il metabolismo dei lieviti, e sostanze polifenoliche, causa di intorbidimenti e gusto aspro alla birra se solubilizzate (Cabras et al., 2004).

In commercio esistono varie tipologie di malto, distinguibili tra loro per le differenti caratteristiche. Tra queste vi è il colore, risultato della reazione tra zuccheri riducenti e aminoacidi (reazione di Maillard) (Briggs et al., 2009) durante il processo di tostatura. Quest'ultima, infatti, può essere effettuata a diverse temperature, ottenendo così differenti colorazioni. Poiché la qualità di malto impiegato influenza notevolmente la produzione (in tutte le sue fasi) e le caratteristiche del prodotto finale (quali schiuma, aroma, colore, stabilità), è fondamentale quindi che la scelta della materia prima impiegata sia consapevole al fine di ottenere un prodotto finale con le caratteristiche desiderate.



Figura 2- Orzo

1.1.2 LUPPOLO

Il luppolo (*figura 3*) è una angiosperma appartenente alla famiglia delle *Cannabaceae*, nella pianta si distinguono le infiorescenze maschili e femminili, quest'ultime verso settembre-ottobre, quando le sono pronte all'impollinazione producono una sostanza resinosa composta da: α -acidi (Luppolina; Umulone; Lupolone), polifenoli (Flobafeni; Xantumolo) ed oli essenziali. Tutte queste sostanze contribuiscono a conferire alla

birra un gusto caratteristico, nella fattispecie gli α -acidi conferiscono il gusto amaricante mentre gli oli ne influenzano maggiormente l'aroma. Inoltre, oltre a dare il caratteristico gusto, il luppolo ha anche proprietà antibatteriche, dovuta all'isomerizzazione degli α -acidi, che vanno ad alterare la composizione della membrana batterica, impedendo la formazione di biofilm ed il trasporto degli elettroni, portando alla morte cellulare (Di Lodovico et al., 2020).



Figura 3- Luppolo

1.1.4 LIEVITO

Il lievito fa parte, insieme al malto, all'acqua e al luppolo, degli ingredienti fondamentali della birra. I lieviti sono dei microrganismi unicellulari, in grado di riprodursi sia in presenza che in assenza di ossigeno. Quando sono inoculati nel mosto, dopo alcune ore, iniziano a nutrirsi degli zuccheri estratti dal malto durante l'ammostamento.

Dalla metabolizzazione di questi zuccheri scaturisce l'alcol etilico, l'anidride carbonica e altri composti come esteri, alcoli superiori e acidi organici derivanti dalla respirazione dei lieviti. L'insieme di questi fattori, unitamente a tutti gli altri derivanti dal malto e dal luppolo, costituisce la struttura organolettica della birra.

L'elemento chiave del processo brassicolo è il lievito, il genere più utilizzato è il *Saccharomyces*, che tradizionalmente è distinto *Saccharomyces pastorianus* (lievito a bassa fermentazione) e *Saccharomyces cerevisiae* (lievito ad alta fermentazione). Differiscono per la temperatura ottimale di fermentazione: bassa dai 8-15°C; alta 12-20°C; il tipo di fermentazione: sul fondo per via della flocculazione o sulla schiuma. (Harrison et al, 2009). La diffusione di questo lievito è dovuta al suo vigore fermentativo, all'elevato potere alcoligeno, alla resistenza agli antisettici ed alla sua adattabilità a diverse condizioni fermentative. (Cabras et al., 2004).

1.2.1 PROCESSO PRODUTTIVO DELLA BIRRA

Il processo di produzione può essere suddiviso in quattro distinte fasi:

- 1) Maltazione
- 2) Ammostatura
- 3) Fermentazione
- 4) Downstream

1.2.1 La Maltazione

In questa fase le lunghe catene insolubili di amido vengono convertite in amidi solubili e vengono attivati gli enzimi che hanno a loro volta il compito di lavorare le proteine e gli amidi. In generale questo processo è suddiviso in tre fasi:

1. **La germinazione**, che inizia quando i grani vengono immersi in acqua per alcuni giorni allo scopo di aumentare il grado di umidità fino al raggiungimento di un valore attorno al 45% (solitamente 48h). Una volta raggiunto il livello di umidità desiderato si stendono i chicchi in ambiente

controllato a 16°C per due settimane. Durante queste due settimane il chicco d'orzo germina producendo una radichetta ed il germoglio, inoltre gli enzimi trasformano le proteine e gli amidi in composti più semplici, amminoacidi e zuccheri, più disponibili per i lieviti nella fase di fermentazione.

2. **L' essicazione** è la fase successiva, si compie mettendo i chicchi a 40°C per circa due giorni in ambiente ventilato.
3. **La tostatura** è l'ultima fase della maltazione, avviene a temperature comprese tra 75-100°C, in questa fase la percentuale d'umidità del chicco crolla fino al 5%. A seconda di particolari processi di tostatura si possono creare dei malti speciali.

È possibile utilizzare il malto in grani o l'estratto di malto, che può essere in forma liquida (30% acqua) o in polvere. L'estratto di malto è costituito da maltosi e destrine, e va ad influire oltre che alle proprietà organolettiche anche il colore della birra (Bokulich et al., 2013).

1.2.2 L'Ammostatura

Ammostatura o mashing è un processo dove la maggior parte delle sostanze insolubili del malto vengono trasformate enzimaticamente al fine di ottenere un composto zuccherino metabolizzabile dai lieviti, ovvero il mosto.

<i>Sosta 1</i>	37- 45°C avviene la degradazione emicellulose e gomme
<i>Sosta 2</i>	45-52°C degradazione proteolitica
<i>Sosta 3</i>	58-63°C le β -amilasi depolimerizzano l'amido in zuccheri semplici come: glucosio, maltosio e maltodestrosio
<i>Sosta 4</i>	68-73°C le α -amilasi producono zuccheri che non fermentano le destrine

La composizione del mosto può variare sia per il tipo di materie prime impiegate, sia per le caratteristiche del processo utilizzato nella sua produzione. Il mosto è ricco di carboidrati, aminoacidi, vitamine, ioni inorganici e lipidi. Questa tecnica verte nel macinare il malto con dell'acqua, portando questa miscela a temperature sempre maggiori, con soste a temperature ben precise, per favorire la miglior solubilizzazione delle sostanze nutritive.

Ci sono due principali metodologie di ammostamento, la prima prevede che il malto venga riscaldato senza mai arrivare all'ebollizione, detto **ammostamento per infusione**, mentre la seconda prevede di portare ad ebollizione una parte della miscela per poi riunirla alla parte principale per alzarne la temperatura, **ammostamento per decozione**. Successivamente il mosto deve essere separato da sostanze in sospensione per scongiurare la possibilità di compromettere la stabilità del prodotto finale, per far ciò il mosto viene separato dalle trebbie tramite filtrazione. Una volta finita questa fase il mosto viene posto in tini di rame e poi fatto bollire per 90-120 minuti, in questa fase viene aggiunto il luppolo, inoltre, questa cottura ha la funzione di sterilizzare, addensare il mosto ed inattivare gli enzimi. Al termine della cottura il mosto viene chiarificato attraverso l'uso di centrifughe che lo separano da piccole particelle in sospensione costituite da proteine, tannini, resine, lipidi.

Infine, il mosto viene fatto raffreddare fino ad una temperatura che permetta la fermentazione, 7-15°C per una bassa fermentazione, 18-25°C per una alta

fermentazione ed insufflato con ossigeno puro o aria sterile per essere pronto ad accogliere i lieviti (Rabin et al., 1998).

1.2.3 Fermentazione

Per avere una buona fermentazione, il lievito utilizzato deve provenire da colture pure e selezionate e devono essere monitorati per avere un tasso di crescita ottimale: apporto di nutrienti, adeguata temperatura, ossigeno disciolto e un corretto inoculo (Lodolo, et al., 2008).

La fermentazione brassicola è suddivisa in: fermentazione primaria e fermentazione secondaria (o maturazione). La fermentazione primaria dura circa 7 giorni, ad una temperatura tra i 15°C per le birre Lager) e i 22°C per la birra Ale. In questa fase vengono fermentati quasi tutti gli zuccheri presenti e formati gran parte dei composti secondari indispensabili per l'aroma della birra. Terminata questa prima fase, la birra passa nei serbatoi di maturazione per la fermentazione secondaria, nella quale vengono fermentati gli zuccheri residui, eliminati i composti indesiderati e migliorato il gusto della birra grazie all'attività dei lieviti ancora presenti (Willaert et al., 2007). Questa seconda fase dura circa 3-5 settimane e la temperatura viene gradualmente ridotta per raggiungere valori di 0–2 ° C per la bassa fermentazione e di 7-10 ° C per l'alta fermentazione.

Affinché il processo di fermentazione venga svolto in maniera ottimale, la temperatura e l'umidità devono rimanere costanti, il pH invece deve essere di circa 5,2-5,3 nel mosto e scendere fino ad un valore di circa 4,1–4,2 a fine fermentazione. Questi valori

sono fondamentali per l'inibizione della crescita batterica e preservare il prodotto finale (Harrison et al., 2009).

1.2.4 Downstream

La birra deve maturare e deve essere filtrata in modo da spiarla da tutte le sostanze solide in sospensione, e pastorizzata mediante due possibili metodi: in tunnel e flash. Nel tunnel le bottiglie vengono bagnate a pioggia da acqua calda a 60°C per 20min, mentre nel metodo flash le bottiglie vengono riscaldate in una stufa a 70°C per 1-1,5min. L'utilizzo del metodo flash essendo più breve consente di conservare le proprietà organolettiche della birra, quindi, è il più utilizzato (Manzoni, et al., 2006).

1.3 BIRRE ARTIGIANALI

Il 6 luglio 2016, viene definitivamente approvata la legge n°154/2016, andando ad integrare la legge 1354/1962, introducendo all'articolo 2 il comma 4 bis:

«Si definisce birra artigianale la birra prodotta da piccoli birrifici indipendenti e non sottoposta, durante la fase di produzione, a processi di pastorizzazione e microfiltrazione. Ai fini del presente comma si intende per piccolo birrificio indipendente un birrificio che sia legalmente ed economicamente indipendente da qualsiasi altro birrificio, che utilizzi impianti fisicamente distinti da quelli di qualsiasi altro birrificio, che non operi sotto licenza e la cui produzione annua non superi i 200.000 ettolitri, includendo in questo quantitativo le quantità di prodotto per conto terzi».

Da un punto di vista tecnico-brassicolo le birre artigianali sono contraddistinte da una rifermentazione in bottiglia che viene effettuata dopo l'aggiunta di zucchero e il reinoculo del lievito starter.

1.4 CEPPI DI LIEVITO NELLA PRODUZIONE DI BIRRA ARTIGIANALE

Genere Saccharomyces

Il principale protagonista del processo brassicolo è il lievito, microorganismo unicellulare appartenente al regno dei funghi, genere *Saccharomyces*. Generalmente suddivisi in lieviti ad alta fermentazione: *Saccharomyces pastorianus* usato a 8-15°C; ed alta fermentazione: *Saccharomyces cerevisiae* usato a 12-20°C.

- *S. pastorianus*, chiamato anche bottom yeast, viene usato per la produzione di birra a bassa fermentazione, i lieviti al termine del processo fermentativo si depositano sul fondo del fermentatore, grazie alla loro capacità di flocculare. La flocculazione è dovuta alla produzione di lectine sulla superficie cellulare durante la fermentazione, queste molecole permettono al lievito di aggregarsi, ciò si verifica solamente quando la concentrazione di zucchero nella soluzione acquosa è sufficientemente bassa (ossia a fine fermentazione). Il catabolismo dello zucchero è fondamentale per la sopravvivenza del lievito, sebbene abbia un'affinità per il glucosio o il maltosio, che viene scomposto in monomeri di glucosio dagli enzimi durante il processo di fermentazione del malto. In assenza di ossigeno avviene la fermentazione anaerobica, dove vengono prodotte una maggiore varietà di molecole come: glicerolo, succinato, acidi

organici ed etanolo. La produzione di etanolo è cruciale per il ruolo di *S. pastorianus* come ceppo di lievito lager. Come già detto con questo lievito si producono le birre Lager e anche le Pilsner, le Helles, le Bock, Monaco. Questo lievito ha una morfologia ovale allungata, si moltiplica per gemmazione (*Figura 4*).

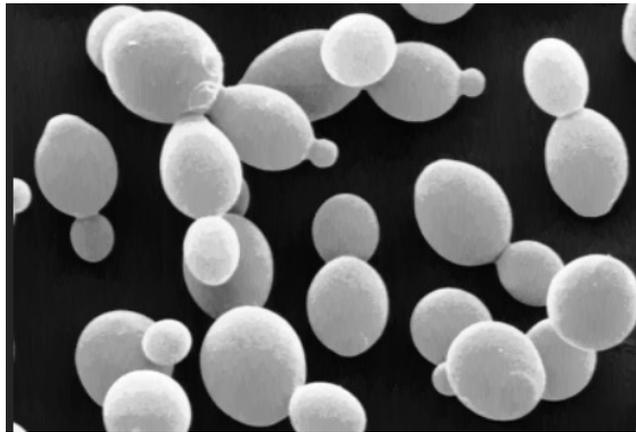


Figura 4- cellule di lievito specie S. pastorianus

- *S. cerevisiae* (*figura 5*) è il lievito più utilizzato nella produzione della birra, poiché possiede elevato vigore fermentativo, elevato potere alcoligeno, elevata resistenza agli antisettici ed anche un'elevata adattabilità alle condizioni fermentative. È il lievito che complessivamente produce la minor quantità di composti secondari e quindi da origini a fermentazioni più pulite, con maggior rendimento in alcol etilico. In presenza di ossigeno e di basse concentrazioni zuccherine utilizza il glucosio per via aerobia, producendo molta biomassa e poco etanolo, al contrario ad alte concentrazioni zuccherine il glucosio viene fermentato producendo grandi quantità di etanolo e poca biomassa. Questo comportamento del lievito è chiamato effetto Crabtree. *S. cerevisiae* ha una classica forma sferica ed anch'esso si divide per gemmazione.

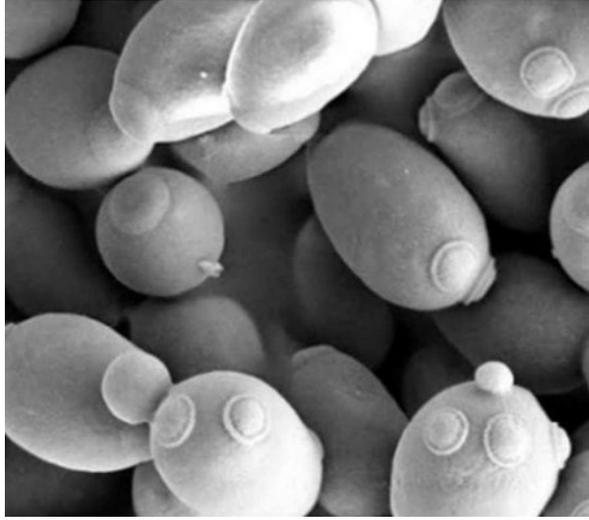


Figura 5 - cellule di lievito S. cerevisiae

Genere *Brettanomyces*

Oggi le specie appartenenti al genere *Brettanomyces* (**figura 6**) sono le specie di lieviti non convenzionali più utilizzati nella produzione di birre acide, oltre a caratterizzarsi per la produzione di un insieme di composti fenolici, spiccano per la capacità di influenzare il profilo organolettico, mediante la produzione di esteri etilici che incrementano l'aroma fruttato e floreale. La differenza con i classici lieviti starter consiste nell'effetto cluster, ossia l'inibizione della fermentazione alcoli in assenza di ossigeno, in condizione aerobica trasforma il glucosio in etanolo e acido acetico. Questi lieviti riescono a metabolizzare una vasta gamma di fonti di carbonio, tra cui destrine e cellobiosio che si trovano nelle botti di legno usate per la fermentazione delle birre. Questi zuccheri vengono degradati dalle β -glucosidasi in zuccheri semplici, facilmente assimilabili. Livelli moderati di etil-acetato ed etil-lattato, prodotti durante la fermentazione, ma concentrazioni più elevate possono conferire note sgradevoli alla bevanda. La morfologia cellulare del lievito può variare da una forma ovoidale a

tubolare allungata. Il lievito è acidogenico e si riproduce velocemente in soluzioni glucosate producendo grandi quantità di acido acetico. Il *Brettanomyces* è molto importante sia per la birrificazione che per la vinificazione. In natura, *Brettanomyces* vive sulle bucce della frutta. Esso venne scoperto all'interno del laboratorio Carlsberg in 1904 da N. Hjelte Claussen, mentre stava studiando le birre britanniche ale. Il nome del genere *Brettanomyces* deriva dal greco e significa "fungo britannico".

(Smith et al., 2008)

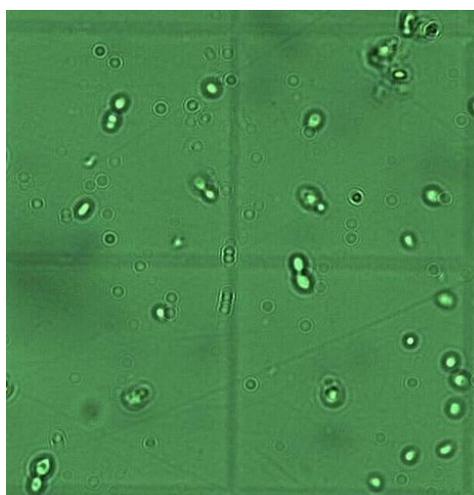


Figura 6 - cellule di Brettanomyces

1.5 PRINCIPALI COMPOSTI AROMATICI NELLA BIRRA

La birra è una bevanda apparentemente semplice, ma non è così: durante la fermentazione, infatti, non vengono prodotti solamente etanolo e anidride carbonica. Infatti, i lieviti sono in grado di produrre molti composti aromatici che derivano dal loro metabolismo secondario. Questi assieme ai composti ottenuti dalla maltazione dell'orzo e gli oli e resine presenti naturalmente nel luppolo, conferiscono alla birra degli aromi unici. Le molecole in questione sono: alcoli superiori, esteri, acidi organici, acetaldeidi, composti carbonilici e terpeni (Pires et al., 2014). Alcoli superiori (propanolo, isobutanolo e alcol isoamilico) sono i composti volatili maggiormente

presenti nella birra, chiamati così perché sono costituiti da più atomi di carbonio rispetto all'etanolo (C2), gli alcoli secondari (C3) e terziari (C4) sono i più comuni. Essi derivano dal metabolismo degli amminoacidi, questi ultimi vanno incontro a transaminazione formando i α -chetoacidi. Successivamente vengono decarbossilati ad aldeidi e ridotti per ottenere gli alcoli superiori (*figura 7*) (Pires et al, 2014).

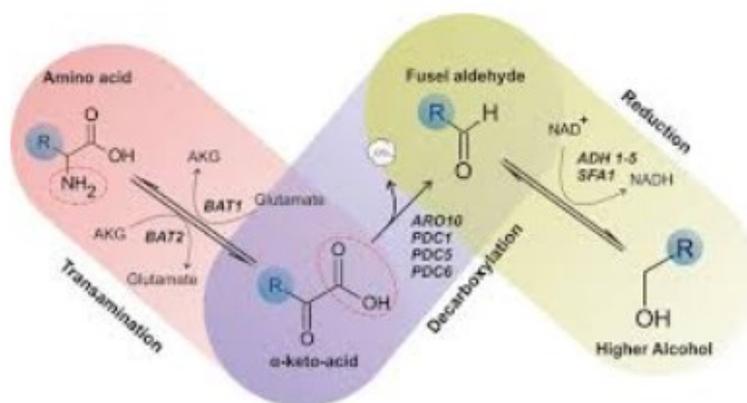


Figura 7- Pathway di Ehrlich che porta alla sintesi degli alcoli superiori

I principali alcoli superiori sono:

- **N-propanolo**: maggiormente presente nelle birre stile lager, contribuisce al loro aroma alcolico con un retrogusto dolciastro.
- **Alcol isoamilico**: conferisce un aroma fruttato, tipico delle birre ale. Generalmente gli aromi spaziano da ananas, mango e arancia.
- **L'isobutanolo**: deriva dal metabolismo della valina, può portare ad aromi sgradevoli se supera la concentrazione il 20% della quantità totale tra n-propanolo, alcol isoamilico e rafforza le proprietà organolettiche dell'alcol isoamilico.

Le varianti del processo fermentativo ossia: il mosto, la temperatura, la pressione e la quantità di ossigeno disciolto influiscono sulla concentrazione delle sostanze aromatiche (Pires et al, 2014).

Dagli alcoli superiori derivano poi gli esteri, che pur essendo in concentrazione inferiore sono i principali responsabili del profilo aromatico della birra. Le concentrazioni nelle birre sono tipicamente meno di 1 ppm per i componenti minori e 10-20 ppm per l'acetato di etile *tabella 2* (Holts et al, 2017).

Tabella 2. Concentrazioni degli esteri nelle birre

ESTERI	CONCENTRAZIONE (ppm)
Etil acetato	8-12
Isobutilacetato	0.03-0.05
Etilbutirrato	0.04-0.06
Acetato di isoamile	1-1.5
Etilsesanoato	0.12-0.18

Vengono prodotti durante la fermentazione primaria tramite reazione di condensazione tra acidi organici e alcoli, catalizzate dagli enzimi dei lieviti. Ci sono due gruppi principali di esteri volatili nelle bevande fermentate. Ci sono due gruppi principali di esteri volatili nelle bevande fermentate.

Il primo gruppo contiene gli esteri acetati in cui il gruppo acido è acetato e il gruppo alcolico è l'etanolo o un alcol complesso. Uno degli esteri più importante è l'acetato di isoamile, responsabile del sapore di banana, lo troviamo nelle Weizen tedesche. Di questi esteri l'acetato di etile è tipicamente presente nella più alta concentrazione, conferendo una nota di solvente, spetta al birraio mantenere le condizioni ottimali per ottenere un prodotto bilanciato (Holts et al., 2017).

Gli esteri etilici i quali rappresentano il secondo gruppo in cui il gruppo alcolico è l'etanolo e il gruppo acido è un acido grasso a catena media, comprendono l'esanoato

di etile (aroma di mela), etile ottanoato (aroma di mela acida) ed etile decanoato (Holts 2017). Tra questi i più rappresentativi sono: l'esanoato di etile, il quale ha una minor concentrazione rispetto agli esteri del primo gruppo.

Lo spettro aromatico degli esteri dipende dalla varietà degli acidi grassi e alcoli presenti nel mosto durante la fermentazione (Holts et al., 2017).

Troviamo poi i composti solforati, vengono prodotti dai lieviti durante la fermentazione, si distinguono l'anidride solforosa, l'idrogeno solforato, troviamo il dimetil-solfuro (DMS) e i mercaptani. L'anidride solforosa agisce come antiossidante e di conseguenza aumenta considerevolmente la durata di conservazione della birra e conferisce stabilità al sapore (Gonzalez et al., 2019).

Un'altra classe sono i composti carbonilici come acetaldeide e diacetile, entrambe sono prodotte naturalmente dai lieviti, ma se superano un valore soglia, per esempio per una proliferazione batterica indesiderata o per degli sbalzi di temperatura durante la fermentazione, possono conferire un aroma sgradevole alla birra. L'acetaldeide una volta superato il valore soglia conferisce un aroma acre, mentre il diacetile un aroma di burro.

I terpenoidi invece sono contenuti nel luppolo e danno amarezza. Sono soprattutto gli α -acidi isomerizzati, a conferire il gusto amaro, in quanto l'isomerizzazione (avviene spontaneamente durante la bollitura del mosto) li solubilizza aumentando il potere amaricante. Questi terpenoidi sono presenti negli oli essenziali presenti nel luppolo e sono composti da più di 300 composti diversi, tra cui: monoterpeni, esteri, solfidi e acidi carbossilici (Gonzalez et al., 2019).

1.6 I MICRORGANSIMI PROBIOTICI

Alla fine del XX secolo lo studioso Eli Mecnikov, fu il primo ad intuire il legame tra salute dell'uomo e gli effetti positivi dei probiotici, ipotizzò che questi effetti erano dovuti ad un migliore equilibrio microbico della flora intestinale, attraverso l'inibizione dei microorganismi patogeni. Dal punto di vista etimologico il termine probiotico deriva dall'unione di pro- (“*a favore di*”) e bios- (“*vita*”), mentre secondo la FAO e OMS ci si può riferire a organismi come probiotici solamente se:

- Il microorganismo è sicuro per l'impiego nell'uomo (GRAS), inoltre non devono essere portatori di antibiotico-resistenze acquisite o trasmissibili
- Essere attivi e vitali a livelli intestinale in quantità tale da giustificare eventuali effetti benefici
- Essere in grado di persistere e moltiplicarsi nell'intestino umano
- Essere in grado di conferire un beneficio fisiologico

I principali organismo probiotici riconosciuti sono i batteri lattici: *lactobacilli* (LAB) e *bifidobatteri*, questi microorganismi vengono solitamente assimilati grazie al consumo di alimenti come yogurt di latte o soia, kefir. Questi alimenti hanno in comune la fermentazione, sono proprio questi microorganismi che trasformano una materia (latte) nel prodotto finito che conosciamo (yogurt).

Oggi sappiamo che l'effetto positivo sulla salute dell'uomo dipende dall'inibizione della proliferazione patogena a livello intestinale, andando ad agire in più punti:

1. Competono per le fonti energetiche e
2. Competono per i siti di adesione alle pareti intestinali

3. Acidificano l'ambiente intestinale: la produzione di acido lattico e altri acidi a corta catena creano un ambiente ostile per la proliferazione di patogeni.
4. Producono molecole antiinfiammatorie: acidi grassi a catena corta come l'acido butirrico, protegge le cellule della mucosa del colon. Inoltre, hanno la capacità di fermentare la fibra alimentare producendo vitamine indispensabili per l'organismo come B12 e K.

Recentemente batteri e lieviti probiotici sono costantemente studiati per il trattamento di varie malattie intestinali. Trial clinici e esperimenti in vivo hanno ampliato la nostra conoscenza del ruolo dei probiotici nei disturbi intestinale dovuti all'alterazione del microbiota come:

- **Disbiosi intestinale**, può essere dovuta ad infezioni batteriche, drastici cambi di diete o antibiotici. Queste alterazioni sono correlate alla sindrome dell'intestino irritato (IBS) e addirittura la celiachia. I probiotici contrastano l'infiltrazione e la crescita dei batteri patogeni competendo per spazio e risorse (Kim et al., 2019).
- **Diarrea associata agli antibiotici**, l'uso prolungato e sconsiderato di antibiotici può azzerare la nostra flora intestinale, portando alla proliferazione di patogeni, magari antibiotico resistenti. Generalmente il patogeno che prolifera più comunemente è *C. difficile*, e studi clinici hanno dimostrato che il trattamento con un mix di probiotici *Lactobacillus* e *S. cerevisiae var. boulardii* riduce il rischio di AAD del 51% (Kim et al., 2019).

- **Morbo di Crohn**, un'inflammatione cronica che affligge l'intestino tenue ed il colon, comporta fitti dolori addominali, febbre perdita di peso. Le sue cause non sono ancora ben note, si ipotizza sia una malattia multifattoriale. L'uso dei probiotici si può aggiungere al comune uso di farmaci steroidei antiinfiammatori per diminuire il loro dosaggio (citotossicità) (Kim et al., 2019).

Cancro al colon (CRC), l'incidenza di questo cancro è in aumento in Europa, Asia e Stati Uniti, i sintomi sono emorragie e perdite di peso, ed è maggiormente dipeso dallo stile di vita. Recenti studi hanno esplorato l'utilizzo dei probiotici come prevenzione al cancro, attraverso una modulazione del meccanismo immunitario (Kim et al., 2019).

1.6.1 Lattic Acid Bacteria (LAB) e Bifidobatteri

La maggior parte dei probiotici appartiene al genere *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. I lattobacilli sono batteri Gram-positivi a forma di bastoncino, nel corpo umano sono presenti nel tratto gastro-intestinale e nella mucosa vulvo-vaginale. Sono importanti per il mantenimento di un pH acido (5-5.5) nel nostro intestino, grazie alla loro capacità di attuare la fermentazione lattica impedendo ai patogeni di proliferare. Tutti i ceppi sono caratterizzati da un'alta affinità di collocazione a livello tissutale della mucosa intestinale, in più sono capaci di vivere in simbiosi con l'organismo ospite. Tra i più importanti troviamo *L. acidophilus*, si è dimostrato capace di ridurre l'inflammatione derivante da coliti, prevenire vaginosi e alleviare gli stati infiammatori cutanei derivati dell'acne (Reuter et al., 2001) (**figura 8**).



Figura 8 - bifidobacterium

1.6.2 Genere *Saccharomyces*

Il *S. cerevisiae* (**figura 9**) è un microorganismo unicellulare osmofilo appartenente al regno dei funghi, comunemente noto come "lievito di birra", è una nota specie di lievito della famiglia Saccharomycetaceae che si riproduce per gemmazione.

Questo lievito ha forma da ovale a ellittica e diametro di 5-10 micrometri. Si moltiplica attraverso un processo di gemmazione, diversa dalla riproduzione che invece prevede riarrangiamento genico. È utile nello studio del ciclo della cellula perché la sua coltura è molto semplice, ma presenta la complessità della struttura interna di piante e animali, anch'essi eucarioti. È probabilmente il lievito più importante nell'ambito dell'alimentazione umana e il suo utilizzo è noto fin dall'antichità per la panificazione, la vinificazione e la produzione di birra. Si pensa che sia stato isolato per la prima volta dalla superficie di acini d'uva; è presente infatti nella pruina. È uno dei microrganismi eucarioti più intensamente studiati in biologia cellulare e molecolare, quanto

l'*Escherichia coli* quale modello dei procarioti. È il microrganismo responsabile del tipo più comune di fermentazione.

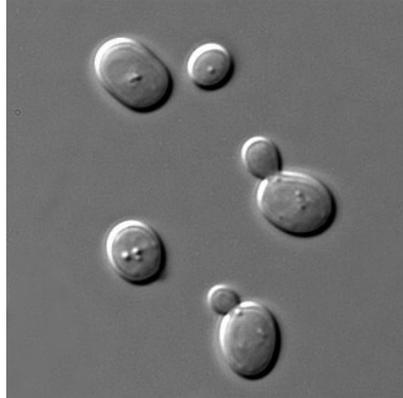


Figura 9 – genere *Saccharomyces*

S. cerevisiae var *boulardii* (**figura 10**) è un ceppo di lievito tropicale isolato per la prima volta nel 1923 dallo scienziato francese Henri Boulard dalla ciliegia della Cina (litchi) e dal frutto del mangostano. Esso è legato, ma distinto dal *S. cerevisiae* in diverse proprietà tassonomiche, metaboliche e genetiche. Il *S. boulardii* ha dimostrato di mantenere e ripristinare la flora naturale del grande e piccolo intestino ed è classificato come un probiotico. Boulard isolò il lievito, dopo aver osservato i nativi del sud est asiatico masticare la buccia di litchi e di mangostano nel tentativo di controllare i sintomi del colera. È dimostrato che il *S. boulardii* non è patogeno, non sistemico (rimane nel tratto gastrointestinale, senza diffondersi in altre parti del corpo), vive e si riproduce ad una temperatura insolitamente alta di 37 °C (Kaźmierczak-Siedlecka et al. 2020). È resistente agli acidi biliari, alla degradazione proteolitica, ai trattamenti antibatterici e antibiotici, e attraversa indenne lo stomaco. Vi sono pubblicazioni (Morè et al., 2015) relative a numerosi studi in doppio cieco, placebo-controllati che dimostrano l'efficacia di *S. boulardii* nel trattamento e nella prevenzione dei disturbi gastrointestinali. Tra questi:

- diarrea acuta,
- infezione ricorrente da *C. difficile*
- sindrome dell'intestino irritabile,
- malattie infiammatorie intestinali,
- diarrea del viaggiatore,
- diarrea associata ad antibiotici,
- diarrea associata a HIV/AIDS.

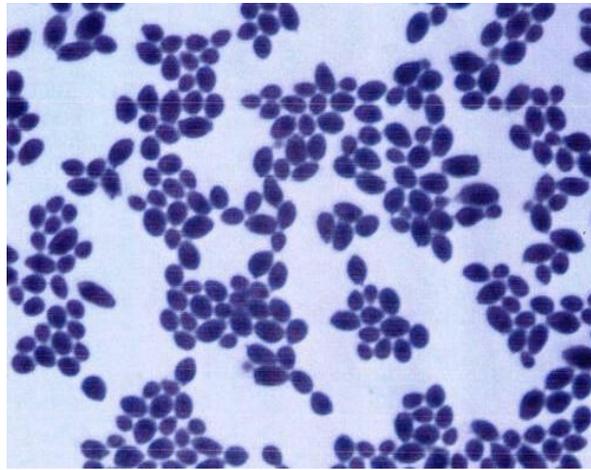


Figura 10 - Saccharomyces boulardii

1.7 ALIMENTI FUNZIONALI E PROBIOTICI

Gli alimenti funzionali sono gli alimenti, freschi o trasformati, naturalmente ricchi di molecole e con proprietà benefiche e protettive per l'organismo, importanti nella

pratica nutrizionale perché, se inseriti in un regime alimentare equilibrato, svolgono un'azione preventiva sulla salute. Il termine è stato coniato in Giappone negli anni '80. Alcuni esempi di alimenti funzionali sono le verdure crucifere, gli agrumi, le bacche (frutti di bosco, bacche di goji, Cranberries, alchechengi) l'aglio, la mela, la melagrana, il pomodoro, la curcuma, la soia, il tè verde e molti altri ancora. Anche lo yogurt e altri prodotti fermentati sono considerati alimenti funzionali, per il loro contenuto in probiotici, microrganismi vivi con benefico impatto sull'ospite attraverso un'azione benefica sul tratto intestinale

Sono considerati alimenti funzionali anche:

frutta, verdura, funghi commestibili, latticini arricchiti con probiotici, tempeh, miso.

Tutti questi alimenti contengono naturalmente sostanze benefiche per la salute dell'uomo come, come polifenoli, flavonoidi, fruttoliti, oligosaccaridi, genisteina, glucosamina, indoli, luteina, licopene, resveratrolo, sulforafano. Tutti questi elementi sono stati ampiamente studiati e sono state descritte in numerosi articoli scientifici le loro proprietà benefiche (Granato et al., 2020).

1.7.1 Proprietà nutraceutiche

Il termine nutraceutico nasce dall'unione delle parole nutriente e farmaceutico, ed indica una sostanza normalmente presente in natura, dotata di proprietà farmacologiche note e dimostrabili. La birra contiene appunto sostanze considerate nutraceutiche come: polifenoli, flavonoidi, vitamine, andando più nello specifico le birre con maggiori proprietà nutraceutiche sono quelle artigianali in quanto l'assenza di pastorizzazione consente di mantenere intatte le sue proprietà organolettiche benefiche per la salute dell'uomo.

Le birre con un più alto contenuto di luppolo possiedono una concentrazione maggiore di flavonoidi, uno dei più studiati è lo xantumolo (*figura 11*), noto per avere proprietà antitumorali. Risulta in grado di inibire la proliferazione del carcinoma mammario, ovarico e tumori del colon, si evidenzia la capacità di indurre apoptosi delle cellule leucemiche (Tuli et al., 2022).

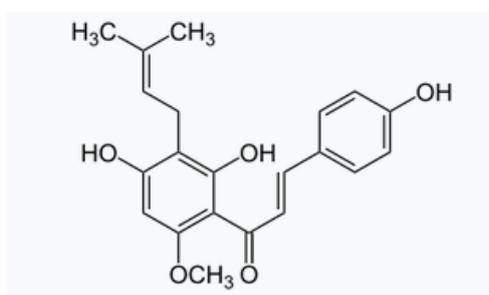


Figura 11- Struttura chimica dello xantumolo

Altri studi dimostrano che agisce contro radicali liberi e può prevenire l'insorgere di malattie cardiovascolari, grazie al suo contenuto di vitamina B6 e antiossidanti (Zhang et al., 2003). Questa bevanda è in grado, inoltre, di aumentare e diluire il flusso urinario ed insieme alla moderata quantità di alcool, favorisce l'espulsione del calcio, prevenendo la formazione di calcoli renali (Ferraro PM, 2013). Alcuni studi evidenziano che la birra ha un effetto antinfiammatorio, in particolare riduce la concentrazione di due proteine pro-infiammatorie, quali: proteina *c-reattiva* e *fibrinogeno*, che contribuisce alla formazione di coaguli.

CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI

Studi recenti hanno dimostrato che un consumo moderato di birra può avere effetti positivi sulla salute umana. La birra è una fonte di vitamine, proteine, polifenoli e fibre. Per queste ragioni, la birra può essere considerata come una bevanda funzionale.

Una delle categorie di birre funzionali è rappresentata dalle birre probiotiche. I microrganismi probiotici sono capaci di apportare benefici alla salute umana aumentando le difese immunitarie e l'equilibrio della flora intestinale. birra artigianale, prodotto non filtrato e non pastorizzato, rappresenta la tipologia di birra più adatta, per l'impiego di microrganismi probiotici. Diversi studi hanno infatti mostrato come ceppi di lievito appartenenti alla specie *S. cerevisiae*, ma anche lieviti non-*Saccharomyces* abbiano caratteristiche probiotiche e funzionali, che associate a caratteristiche tecnologiche possono trovare impiego nell'industria brassicola.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di analizzare delle birre artigianali provenienti dal birrificio artigianale "La casa di cura" in provincia di Teramo. Le birre analizzate sono 3; descritte dall'azienda brassicola come probiotiche per via dell'aggiunta del Kombutcha.

Il Kombutcha è una bevanda fermentata prodotta a partire dal tè, durante la fermentazione si forma lo SCOBY acronimo che sta per Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast, ed è appunto uno strato solido dove lieviti e batteri sono in simbiosi.

Nel presente progetto di tesi si è voluto analizzare alcune caratteristiche probiotiche e inoltre alcune caratteristiche aromatiche della birra.

CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI

3.1 BIRRE ANALIZZATE

Le birre analizzate provengono dal birrificio artigianale “La casa di cura” in provincia di Teramo e fanno parte delle loro birre della linea probiotica. Vengono prodotte con l’aggiunta del Kombucha (tè fermentato).

Le birre analizzate sono le seguenti:

- **Candida:** è una birra dal tenore alcolico medio. Trae ispirazione dalla tipologia delle **Saison/Farmhouse Ale**, importante famiglia di birre storicamente legate alla produzione nelle fattorie, contraddistinte da grande forza dissetante, un profilo aromatico articolato e una notevole bevibilità. In aggiunta tra gli ingredienti speciali si segnala l'uso di **fermentato di tè**. Nel profilo aromatico si ritrovano ovviamente suggestioni provenienti dalla presenza di fermentato di tè, oltre a note di cereali, agrumi e spezie. Infine, successivamente si avvertono sfumature di albicocca, erba tagliata, banana, cantina, fiori e terra.

(Figura 12)



Figura 12- Birra Candida

- **Skizo:** si tratta di una Kombucha Sour Saison che unisce il mondo delle birre artigianali a quello del Kombucha. Per realizzare Skizo viene fatta maturare la

Saison del birrifico con Kombucha ed aggiunta, in questo caso, di mele, questo da vita ad una birra dal profilo "sour" fresca e fruttata, dalla componente probiotica interessante. Piacevolmente acidula nei sentori. **(figura 13)**



Figura 13- Birra Skizo

- **Flora:** Per realizzare Flora viene fatta maturare la Saison del birrifico con Kombucha ed aggiunta, in questo caso, di rapa rossa, questo dà vita ad una birra dal profilo "sour" e dalla componente probiotica interessante. Piacevolmente acidula nei sentori. **(figura 14)**



Figura 14- Birra flora

3.2 TERRENI DI CULTURA

- **Wallerstein Laboratory nutrient agar (WL):** è un terreno solido per l'analisi della popolazione microbiologica. In campo enologico e brassicolo permette la differenziazione dei lieviti selvatici, a seconda della loro morfologia.

COMPONENTE	QUANTITA (g/L)
Estratto di lievito	4.0
Tryptone	5.0
Destrosio	50.0
Potassio fosfato diidrogenato	0.55
Cloruro di potassio	0.426
Cloruro di calcio	0.125
Solfato di magnesio	0.125
Cloruro di ferro	0.0025
Solfato di manganese	0.0025
Verde di bromocresolo	0.022
Agar	15.0
pH	5.5 ± 0.2

Il terreno è stato preparato semplicemente con una pesata dal prodotto secco pronto ed aggiunto il volume d'acqua necessario per piastrare, solitamente (600ml) si porta ad ebollizione per sciogliere la polvere, si sterilizza in autoclave a 121°C per 90 minuti e poi si procede con la distribuzione del terreno WL in piastra. Il terreno disidratato si presenta come polvere bianca o giallo paglierino mentre il gel risultante è di colore blu, il colore della piastra seminata vira al verde per il conseguente abbassamento del pH (**Figura 15**)

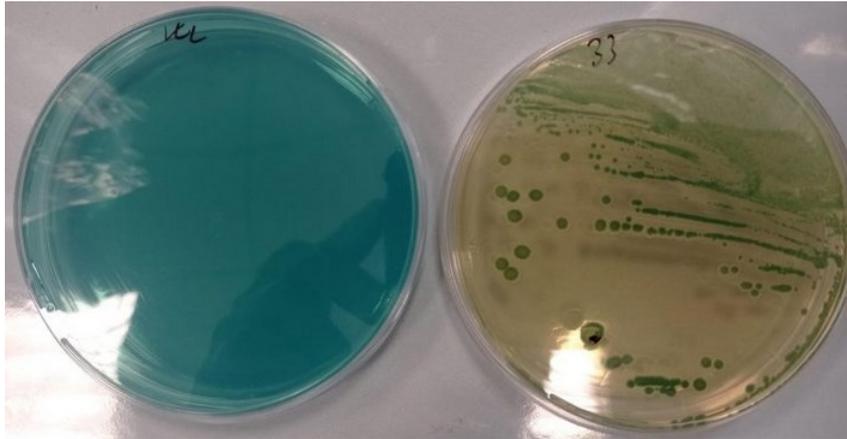


Figura 15 - a sinistra il terreno senza i lieviti a destra il terreno seminato con i lieviti

- **Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YPD agar):** non è un terreno selettivo e permette il mantenimento delle culture isolate è utilizzato per effettuare conte, creare Master e Working bank. È costituito da: Estratto di lievito (1%), peptone (2%), glucosio (2%), e agar (2%). Nella preparazione dei 500ml di terreno sono stati pesati 5g di estratto di lievito, 10g di glucosio, 10g di peptone, 10 grammi di agar. Per la produzione di YPD broth, ovvero il medesimo terreno in forma liquida, utile per controllare la crescita dei lieviti allo spettrofotometro o camera di Burker. *(figura 16)*



Figura 16 - Terreno YPD

- **Yeast nitrogen base (YNB):** è un brodo di cultura ricco, ideale per la crescita di lieviti. La preparazione del brodo avviene con la pesata

COMPONENTE	QUANTITÀ (µg/L)
Biotina	2.0
Pentotenato di calcio	400
Acido folico	2.0
Inositolo	2.0 (mg/L)
Acido nicotinico	400
Acido p-Aminobenzoico	200
Pirodixina	400
Riboflavina	200
Tiamina	400

3.3 ANALISI CHIMICHE

3.3.1 Estrazione con tecnica SPME

L'analisi della componente volatile è stata eseguita con la tecnica SPME in spazio di testa (HS-SPME), utilizzando la fibra a tripla fase divinilbenzeneI(DVB)/carboxen(CAR)/polidimetilsilossano(PDMS) (*figura 17*)



Figura 17-Strumento SPME fibra a tripla fase divinilbenzene(DVB)/carboxen(CAR)/polidimetilsilossano(PDMS)

Nello specifico l'estrazione della componente volatile della birra è stata eseguita come segue: 1g di NaCl vengono inseriti in un'apposita vials, successivamente sono aggiunti 5ml di birra da analizzare. La soluzione viene mescolata mediante un'ancoretta per 10min, il sale una volta disciolto completamente funge da stabilizzante. Al termine di questa fase avviene il condizionamento della fibra, per l'adsorbimento degli analiti, la fibra viene inserita nella vials e fatta uscire dall'ago. Il tutto si pone in stufa a 55°C per 40min. Passato questo tempo la fibra viene retratta in ago ed è pronta per iniziare l'analisi mediante gas-cromatografo (GC). L'ago viene inserito nella porta dell'iniettore del gas-cromatografo, sempre con la fibra retratta, si preme lo stantuffo per e si espone la fibra alla zona riscaldata del GC, in questo modo gli analiti si staccano dalla fibra e passano alla colonna d'analisi. Il tempo di esposizione della fibra è di 5min mentre il tempo di analisi è di 80min. Conoscendo il tempo di ritenzione dei composti standard è possibile trovarli e calcolarne le concentrazioni grazie ai picchi che leggiamo nel cromatogramma del nostro campione.

3.3.2 Alcoli superiori

La preparazione del campione per la valutazione degli alcoli superiori, prevede la filtrazione di una piccola aliquota di birra (10ml) con un filtro cut-off 0.2µm, a cui viene aggiunto 2µl di 1-pentanololo. A questo punto si procede all'analisi mediante gas-cromatografia (GC): 1µl di campione viene iniettato direttamente nel gascromatografo Shimadzu GC-2014, utilizzando la colonna capillare Zebron ZB-WAX Plus, secondo il seguente protocollo:

- Temperatura iniettore 150°C
- Colonna Zebron ZB-WAX plus in polietilenglicole

- Iniettore: split 10:2, iniettato 1µl di campione
- Temperatura: T iniziale 35°C per 4min, poi gradiente per 5°C/min fino a 200°C ed isoterma di 200°C per 1 min
- Gas vettore: Azoto

Ogni composto contenuto nel campione fornisce un segnale (picco) che permette la sua identificazione sulla base del tempo impiegato per arrivare al rilevatore

3.4 VALUTAZIONE CEPPI COME POSSIBILI PROBIOTICI

Si sono effettuate delle prove per verificare la possibile attività probiotica dei lieviti isolati.

3.4.1 Conta lieviti nelle birre analizzate

Per ogni birra è stata effettuata una conta microbiologica, in una prima fase sono state effettuate delle conte in terreno WL agar. Partendo dalla birra ed effettuando delle diluizioni seriali è stato prelevato 1 ml di campione originario ed è stato posto in una provetta contenente 9ml di acqua sterile. Si è poi ripreso un 1 ml da questa soluzione ed aggiunta in un'altra provetta con 9ml di acqua sterile, si è proceduto così finché non si è arrivati ad una diluizione di 10^{-5} . (*Figura 18*)

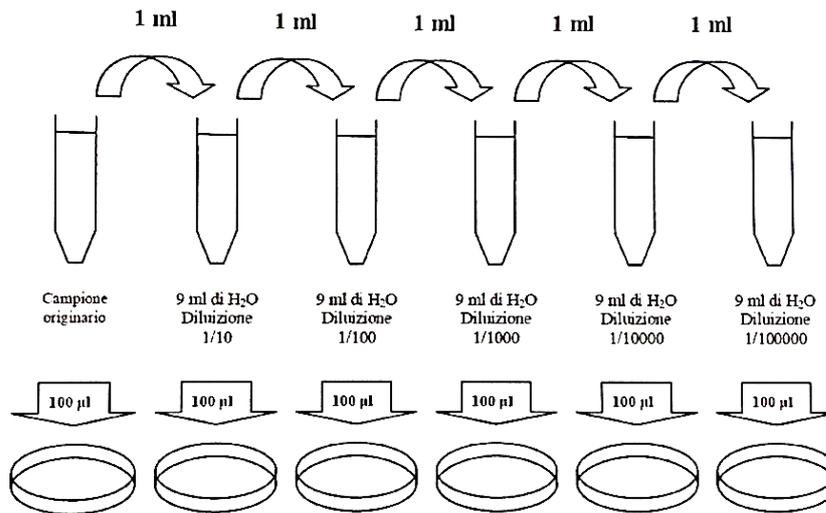


Figura 18 - schema delle diluizioni

Successivamente di sono trasferiti 100µl di ogni soluzione sulle Petri con il WL agar, quindi con una ansa ad L, dopo essere sterilizzata con un passaggio in alcool e fiamma ed una volta raffreddata su un bordo del terreno si può procedere alla distribuzione omogenea della soluzione sul terreno. Dopo un periodo di incubazione a temperatura ambiente le colonie sono cresciute e si sono considerate solamente le piastre dove erano distinguibili le colonie singole, nel mio caso le piastre con una diluizione 10^{-2} e 10^{-3} .

Si è effettuata una valutazione morfologica delle colonie, ovvero mediante l'osservazione delle conformazioni delle varie colonie si è potuto capire il ceppo di appartenenza di quel lievito. Si sono distinte colonie appartenenti al genere:

- *Saccharomyces*
- *Brettanomyces*
- *Candida*

Successivamente si sono effettuate semine delle colonie singole in YPD agar per poter avere uno stock con cui lavorare nelle analisi di valutazione probiotica successiva. In sterilità, mediante fiamma, si è utilizzata un'ansa metallica per prelevare parte di una colonia singola isolata nel terreno WL, e seminarla nel nuovo terreno. (*figura 19*)

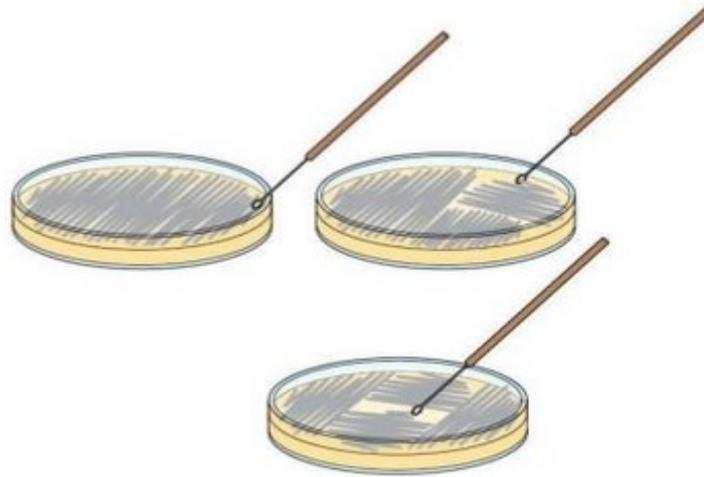


Figura 19 - semina sul terreno

3.4.2 Vitalità e crescita a 37°C

Per essere considerati probiotici i microorganismi devono sopravvivere e crescere nel nostro organismo. Uno dei primi ostacoli che devono superare è la nostra temperatura corporea di 37°C. Per osservare la resistenza dei lieviti isolati a questa temperatura si è stemperata una colonia singola per ogni lievito in una sterilin con circa 10ml di YPD broth. Sono state fatte delle letture allo spettrofotometro, che hanno permesso di effettuare delle diluizioni per avere delle culture iniziali ad una concentrazione di 10^6 cellule/ml. Successivamente sono state messe in stufa a 37°C per 24h, per simulare le condizioni del nostro organismo. Dopodiché è stato prelevato circa 1ml di cultura e posto in una sterilin, ad esso è stato aggiunto una goccia di *blu di metilene* all'1% che mi

permette di distinguere le cellule vive, che rimangono incolori da quelle morte che si colorano di blu. Si sono attesi 5min per far penetrare il colorante nelle cellule morte e poi si sono prelevati 5 μ l dalla soluzione e posti nella camera di burker e contati al microscopio ottico (*figura 20*).



Figura 20- Camera di Burker

3.4.3 Vitalità e crescita a 37°C, pH 2 e Sali biliari

Per saggiare la capacità dei diversi lievii di sopravvivere al tratto gastrico si è allestita la seguente prova. Si è stemperata una colonia singola per ogni lievito in una sterilin con 10ml di YPD broth e si è incubata per 24h, successivamente mediante spettrofotometria si sono inoculate 10⁶ cell/ml in 2 sterilin contenuti: YNB e YNB + Sali biliari e pH 2. Quest'ultimo terreno grazie alla presenza dei Sali biliari ed al suo pH fortemente acido, ricavato grazie all'aggiunta goccia a goccia di HCl 1M ed un pH-metro a sonda, permette di simulare l'ambiente gastrico. Così facendo si sono ricavate 2 inoculi per ogni lievito, uno in YNB che servirà per controllo della crescita, ed il secondo con YNB + Sali biliari e HCl per il test di vitalità. Successivamente si

sono incubate le sterilin a 37°C per 24h, trascorso questo lasso di tempo da ogni inoculo si è prelevato all'incirca 1ml e posto in un'ependorf dove poi è stata aggiunta una goccia di *blu di metilene* all'1%, che permea solamente nelle cellule morte colorandole di blu, mentre quelle vive rimangono incolori.

3.4.4 Valutazione attività antiossidante della matrice

Per la valutazione dell'attività antiossidante della matrice si è utilizzato il protocollo con il DPPH. Il DPPH è il radicale 1,1-difenile-2-picrididrazil (SIGMA). La prova permette di determinare il potere antiossidante mediante il potenziale di riduzione del radicale chimico DPPH attraverso il trasferimento di un idrogeno. Il DPPH inizialmente di colore viola si riduce a DPPH-H virando in un giallo pallido. Per ogni campione si allestisce un doppio prelevano 800µl di matrice e si aggiungono 1ml di DPPH. Si procede con il bianco costituito da 1ml di DPPH e 800µl di acqua deionizzata.

Si può subito notare che avviene un viraggio al giallo paglierino in tutti i campioni che contengono la matrice di birra, mentre il bianco rimane di colore violetto. I campioni si portano al vortex per far miscelare correttamente, poi vengono incubati per 30min al buio a temperatura ambiente. Si centrifugano i campioni a 12000 rpm per 5 minuti e successivamente si misura l'assorbanza a 517nm prelevando 1ml di surnatante e mettendolo in apposite cuvette.

Il DPPH (*figura 21*) è ben conosciuto come radicale, ma in realtà è anche uno "scavenger" di altri radicali. Quando è in forma radicalica ha una spiccata assorbanza

alla lunghezza d'onda di 517nm, mentre cala quando viene ridotto, stabilizzandosi. Questa peculiarità può essere sfruttata per monitorare il potere antiossidante di matrici organiche o composti puri.

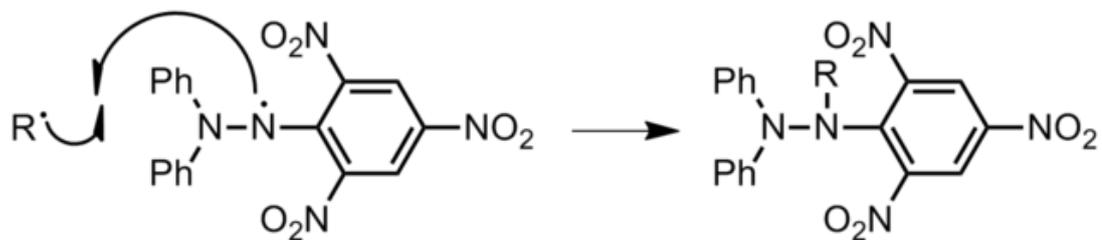


Figura 21 - Riduzione del radicale DPPH

CAPITOLO 4 – RISULTATI

4.1 Isolamento lieviti delle birre analizzate

Nella *tabella 1* sono rappresentate il numero di cellule per isolate per ogni campione di birra, Ogni campione di birra si è rilevato unico, per esempio sebbene le birre “Flora” e “Candida” abbiano un numero di isolati simili il rapporto tra le specie isolate è sempre diverso. Nella birra “Flora” riscontriamo un numero più elevato del genere *Brettanomyces*, rispetto alle altre due specie comprese nel pool di lieviti isolati. Nella birra “Candida” invece si nota come i valori dei generi *Brettanomyces* e *Candida* siano equiparabili (stesso ordine di grandezza), al contrario del genere *Saccharomyces*. Infine, la birra “Skizo” presenta un numero cellule del genere *Saccharomyces* maggiore rispetto ai generi *Brettanomyces* e *Candida*.

Tabella 1- Sono riportati il log CFU/ml e la specie presuntiva di appartenenza del ceppo isolato, per ogni campione di birra.

	<i>Saccharomyces</i>	<i>Brettanomyces</i>	<i>Candida</i>
Flora	3.9	3.6	4.5
Candida	3.8	5.1	4.1
Skizo	5.5	5.1	5.4

Per ogni birra analizzata sono stati isolati dai 15 fino a 20 ononie per ogni specie, con cui sono stati svolti gli esperimenti per la valutazione dell’attività probiotica.

4.2 Valutazione dei ceppi isolati come possibili probiotici

Per valutare la possibile attività probiotica dei ceppi di lieviti isolati si sono condotte le seguenti prove:

- Test vitalità 37°C
- Test vitalità 37°C con Sali biliari e pH 2
- Attività antiossidante della matrice

Queste prove hanno lo scopo di testare la resistenza dei lieviti presenti nei campioni analizzati, durante il transito nel tratto gastro-intestinale. Se si vuole definire un microrganismo probiotico è indispensabile che riesca ad arrivare vivo e replicarsi nell'intestino.

4.2.1 Test vitalità a 37°C

Nelle varie tabelle è riportata la vitalità dei singoli ceppi isolati. Nella tabella 3,4,5 si riportano i ceppi isolati dalla birra Flora, in quelle 6,7 e 8 quelli isolati da Skizo ed infine 9,10 e 11 i ceppi isolati nella birra Candida. In tutti i campioni riscontriamo una crescita rispetto all'inoculo iniziale, tutti mostrano un'ottima vitalità con una bassa percentuale di cellule morte. Il genere *Saccharomyces* risulta quello con una crescita maggiore.

Tabella 3- Vitalità 37°C ceppi di *S. cerevisiae* isolati dalla birra Flora

Ceppi <i>S.cerevisiae</i> da Flora	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
F. Sc1	4.5 *10 ⁸	93	7
F. Sc2	5.8*10 ⁸	91	9
F. Sc3	4.2*10 ⁸	81	19
F. Sc4	5.5*10 ⁸	80	20
F. Sc5	5.8*10 ⁸	89	11

F. Sc6	4.3*10 ⁸	91	9
F. Sc7	5.2*10 ⁸	91	9
F. Sc8	4.9*10 ⁸	82	18
F. Sc9	5.5*10 ⁸	80	20
F. Sc10	5.3*10 ⁸	82	18
F. Sc11	5.8*10 ⁸	81	19
F. Sc12	4.3*10 ⁸	90	10
F. Sc13	4.7*10 ⁸	85	15
F. Sc14	4.5*10 ⁸	88	12
F. Sc15	5.4*10 ⁸	93	7

Tabella 4- Vitalità 37°C ceppi di Brettanomyces isolati dalla birra Flora

Ceppi Brettanomyces da Flora	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
F. B1	5.9*10 ⁷	91	9
F. B2	7.2*10 ⁷	90	10
F. B3	1.19*10 ⁸	84	16
F. B4	1.2*10 ⁸	90	10
F. B5	5.3*10 ⁷	84	16
F. B6	1.0*10 ⁸	86	14
F. B7	9.69*10 ⁸	80	20
F. B8	8.1*10 ⁷	80	20
F. B9	1.16*10 ⁸	81	19
F. B10	1.00*10 ⁸	84	16
F. B11	6.5*10 ⁷	85	15
F. B12	6.8*10 ⁷	85	15
F. B13	8.4*10 ⁷	90	10
F. B14	9.3*10 ⁷	87	13
F. B15	5.6*10 ⁷	92	8
F. B16	1.13*10 ⁸	88	12
F. B17	7.5*10 ⁷	84	16
F. B18	6.25*10 ⁷	88	12

Tabella 5- Vitalità 37°C ceppi di Candida isolati dalla birra Flora

Ceppi Candida da Flora	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
F. C1	8.1*10 ⁷	89	11
F. C2	8.4*10 ⁷	93	7
F. C3	6.8*10 ⁷	93	7
F. C4	7.5*10 ⁷	92	8
F. C5	1.00*10 ⁸	90	10

F. C6	$6.5 \cdot 10^7$	82	18
F. C7	$6.5 \cdot 10^7$	84	16
F. C8	$1.03 \cdot 10^8$	83	17
F. C9	$7.8 \cdot 10^8$	88	12
F. C10	$1.1 \cdot 10^8$	90	10
F. C11	$9.3 \cdot 10^7$	89	11
F. C12	$8.1 \cdot 10^7$	83	17
F. C13	$1.1 \cdot 10^7$	93	7
F. C14	$1.0 \cdot 10^7$	85	15
F. C15	$1.1 \cdot 10^7$	93	7

Tabella 6- Vitalità 37°C ceppi di *Saccharomyces* isolati dalla birra Skizo

Ceppi di <i>Saccharomyces</i> da Skizo	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
S. Sc1	$2.7 \cdot 10^8$	84	16
S. Sc2	$2.5 \cdot 10^8$	76	24
S. Sc3	$2.7 \cdot 10^8$	80	20
S. Sc4	$2.9 \cdot 10^8$	82	18
S. Sc5	$3.0 \cdot 10^8$	83	17
S. Sc6	$2.8 \cdot 10^8$	83	17
S. Sc7	$3.3 \cdot 10^8$	78	22
S. Sc8	$2.6 \cdot 10^8$	81	19
S. Sc9	$3.1 \cdot 10^8$	79	21
S. Sc10	$3.3 \cdot 10^8$	76	24
S. Sc11	$2.5 \cdot 10^8$	85	15
S. Sc12	$3.2 \cdot 10^8$	83	17
S. Sc13	$3.3 \cdot 10^8$	85	15
S. Sc14	$3.4 \cdot 10^8$	77	23
S. Sc15	$3.2 \cdot 10^8$	76	24

Tabella 7- Vitalità 37°C ceppi di *Brettanomyces* isolati dalla birra Skizo

Ceppi <i>Brettanomyces</i> da Skizo	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
S. B1	$7.8 \cdot 10^7$	82	18
S. B2	$7.5 \cdot 10^7$	82	18
S. B3	$1.0 \cdot 10^7$	84	16

S. B4	1.2*10 ⁸	79	21
S. B5	1.3*10 ⁸	80	20
S. B6	1.0*10 ⁸	81	19
S. B7	1.0*10 ⁸	78	22
S. B8	1.1*10 ⁸	82	18
S. B9	1.3*10 ⁸	81	19
S. B10	1.0*10 ⁸	78	22
S. B11	1.3*10 ⁸	85	15
S. B12	8.4*10 ⁸	75	25
S. B13	7.1*10 ⁸	84	16
S. B14	1.1*10 ⁸	78	22
S. B15	1.0*10 ⁸	78	22
S. B16	9.7*10 ⁸	82	18
S. B17	8.7*10 ⁷	80	20
S. B18	8.4*10 ⁷	76	24

Tabella 8- Vitalità 37°C ceppi di *Candida* isolati dalla birra Skizo

Ceppi di <i>Candida</i> isolati da Skizo	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
S. C1	8.7*10 ⁷	78	22
S. C2	7.81*10 ⁷	78	22
S. C3	7.19*10 ⁷	82	18
S. C4	1.2*10 ⁷	80	20
S. C5	8.4*10 ⁷	76	24
S. C6	1.1*10 ⁷	80	20
S. C7	1.1*10 ⁷	79	21
S. C8	8.75*10 ⁷	82	18
S. C9	1.2*10 ⁷	82	18
S. C10	9.0*10 ⁷	85	15
S. C11	1.2*10 ⁷	79	21
S. C12	1.2*10 ⁷	75	25
S. C13	7.1*10 ⁷	85	15
S. C14	1.0*10 ⁷	83	17
S. C15	1.1*10 ⁸	81	19

Tabella 9- Vitalità 37°C ceppi di *Saccharomyces* isolati dalla birra Candida

Ceppi <i>Saccharomyces</i> isolati da Candida	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
C. Sc1	2.9*10 ⁸	80	20
C. Sc2	2.8*10 ⁸	81	19
C. Sc3	2.9*10 ⁸	81	19

C. Sc4	2.9*10 ⁸	85	15
C. Sc5	3.1*10 ⁸	88	12
C. Sc6	2.9*10 ⁸	89	11
C. Sc7	3.00*10 ⁸	86	14
C. Sc8	2.6*10 ⁸	78	22
C. Sc9	2.7*10 ⁸	89	11
C. Sc10	2.8*10 ⁸	80	20
C. Sc11	3.0*10 ⁸	86	14
C. Sc12	2.7*10 ⁸	85	15
C. Sc13	2.6*10 ⁸	90	10
C. Sc14	2.7*10 ⁸	84	16
C. Sc15	3.0*10 ⁸	82	18

Tabella 10- Vitalità 37°C ceppi di *Brettanomyces* isolati dalla birra Candida

Ceppi <i>Brettanomyces</i> isolati da Candida	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
C. B1	7.8*10 ⁷	81	19
C. B2	1.0*10 ⁷	80	20
C. B3	8.7*10 ⁷	79	21
C. B4	7.1*10 ⁷	85	15
C. B5	9.0*10 ⁷	80	20
C. B6	6.8*10 ⁷	86	14
C. B7	1.1*10 ⁸	79	21
C. B8	8.1*10 ⁷	89	11
C. B9	9.3*10 ⁷	88	12
C. B10	1.2*10 ⁸	90	10
C. B11	1.1*10 ⁸	89	11
C. B12	9.6*10 ⁷	87	13
C. B13	1.0*10 ⁸	78	22
C. B14	9.3*10 ⁷	89	11
C. B15	6.5*10 ⁷	75	25
C. B16	1.2*10 ⁷	85	15
C. B17	7.8*10 ⁷	84	16
C. B18	7.8*10 ⁷	85	15

Tabella 11- Vitalità 37°C ceppi di *Candida* isolati dalla birra Candida

Ceppi di <i>Candida</i> isolati da Candida	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
C. C1	1.03*10 ⁸	86	14
C. C2	8.75*10 ⁷	86	14
C. C3	7.19*10 ⁷	78	22

C. C4	$6.88 \cdot 10^7$	81	19
C. C5	$1.03 \cdot 10^8$	80	20
C. C6	$8.7 \cdot 10^7$	84	16
C. C7	$7.1 \cdot 10^7$	79	21
C. C8	$6.2 \cdot 10^7$	89	11
C. C9	$1.1 \cdot 10^8$	79	21
C. C10	$1.1 \cdot 10^8$	79	21
C. C11	$8.1 \cdot 10^8$	89	11
C. C12	$1.2 \cdot 10^8$	87	13
C. C13	$8.7 \cdot 10^7$	82	18
C. C14	$8.7 \cdot 10^7$	80	20
C. C15	$1.2 \cdot 10^7$	89	11

4.2.2 Test vitalità 37°C, Sali biliari e pH 2

Nelle tabelle sottostanti sono riportati i test di vitalità di ogni ceppo isolato. In entrambi i tipi di terreni abbiamo un aumento della concentrazione cellulare rispetto all'inoculo iniziale. La differenza sostanziale è che con la presenza dei Sali biliari e un pH acido diminuisce la vitalità in tutti i ceppi isolati di ogni campione. Se nel terreno di controllo YNB troviamo una media della percentuale di morte cellulare del 20,6%, nel terreno che va a simulare il tratto gastro-intestinale il valore arriva al 50,1%.

Tabella 12- Vitalità 37°C + Sali biliari a pH 2 dei ceppi *Saccharomyces* isolati da Flora

Ceppi <i>Saccharomyces</i> da Flora	Terreno YNB			Terreno YNB + Sali biliari pH2		
	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
F. Sc1	1.03*10 ⁸	93	7	1.4*10 ⁸	63	37
F. Sc2	8.75*10 ⁷	91	9	1.2*10 ⁸	71	29
F. Sc3	7.1*10 ⁷	81	19	1.3*10 ⁸	64	36
F. Sc4	1.03*10 ⁸	80	20	1.3*10 ⁸	54	46
F. Sc5	8.7*10 ⁷	89	11	1.4*10 ⁸	60	40
F. Sc6	7.1*10 ⁷	91	9	1.2*10 ⁸	58	42
F. Sc7	1.0*10 ⁷	91	9	1.2*10 ⁸	64	36
F. Sc8	8.7*10 ⁷	82	18	1.4*10 ⁸	56	44
F. Sc9	7.1*10 ⁷	80	20	1.2*10 ⁸	59	41
F. Sc10	1.0*10 ⁷	82	18	1.4*10 ⁸	61	39
F. Sc11	8.7*10 ⁷	81	19	1.0*10 ⁸	55	45
F. Sc12	7.1*10 ⁷	90	10	1.3*10 ⁸	57	43
F. Sc13	1.0*10 ⁷	85	15	1.3*10 ⁸	62	38
F. Sc14	8.7*10 ⁷	88	12	1.1*10 ⁸	67	33
F. Sc15	7.1*10 ⁷	93	7	9.7*10 ⁸	64	36

Tabella 13- Vitalità 37°C + Sali biliari a pH 2 dei ceppi *Brettanomyces* isolati da Flora

Ceppi <i>Brettanomyces</i> da Flora	Terreno YNB			Terreno YNB + Sali biliari pH2		
	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
F. B1	5.9*10 ⁷	91	9	6.3*10 ⁷	68	32
F. B2	7.2*10 ⁷	90	10	8.1*10 ⁷	66	34
F. B3	1.2*10 ⁸	84	16	8.8E*10 ⁷	54	46
F. B4	1.2*10 ⁸	90	10	5.3*10 ⁷	51	49
F. B5	5.3*10 ⁷	84	16	5.0*10 ⁷	62	38
F. B6	1.1*10 ⁸	86	14	7.2*10 ⁷	63	37
F. B7	9.7*10 ⁷	80	20	8.8*10 ⁷	68	32
F. B8	8.1*10 ⁷	80	20	6.3*10 ⁷	72	28
F. B9	1.2*10 ⁸	81	19	6.9*10 ⁷	76	24
F. B10	1.0*10 ⁸	84	16	8.4*10 ⁷	71	29
F. B11	6.6*10 ⁷	85	15	5. *10 ⁷	53	47
F. B12	6.9*10 ⁷	85	15	5.3*10 ⁷	57	43
F. B13	8.4*10 ⁷	90	10	6.6*10 ⁷	59	41
F. B14	9.4*10 ⁷	87	13	8.4*10 ⁷	65	35
F. B15	5.0 *10 ⁷	92	8	7.5*10 ⁷	63	37
F. B16	1.0*10 ⁸	88	12	5.6*10 ⁷	67	33
F. B17	7.5*10 ⁷	84	16	6.6*10 ⁷	71	29
F. B18	6.3*10 ⁷	88	12	7.8*10 ⁷	64	36

Tabella 14- Vitalità 37°C + Sali biliari a pH 2 dei ceppi *Candida* isolati da Flora

Ceppi <i>Candida</i> da Flora	Terreno YNB			Terreno YNB + Sali biliari pH2		
	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
F. C1	8.1*10 ⁷	89	11	1.2*10 ⁸	69	31
F. C2	8.4*10 ⁷	93	7	9.7*10 ⁷	53	47
F. C3	6.9*10 ⁷	93	7	1.0*10 ⁸	62	38
F. C4	7.5*10 ⁷	92	8	9.4*10 ⁷	66	34
F. C5	1.0*10 ⁸	90	10	8.4*10 ⁷	71	29
F. C6	6.6*10 ⁷	82	18	1.0*10 ⁷	75	25
F. C7	6.6*10 ⁷	84	16	1.1*10 ⁸	71	29
F. C8	1.0*10 ⁸	83	17	1.1*10 ⁸	63	37
F. C9	7.8*10 ⁷	88	12	7.8*10 ⁸	64	36
F. C10	1.2*10 ⁸	90	10	8.4*10 ⁸	60	40
F. C11	9.4*10 ⁸	89	11	1.0*10 ⁸	56	44
F. C12	8.1*10 ⁸	83	17	1.1*10 ⁸	54	46
F. C13	1.2*10 ⁸	93	7	8.1*10 ⁸	51	49
F. C14	1.1*10 ⁸	85	15	9.1*10 ⁸	55	45
F. C15	1.1*10 ⁸	93	7	6.9*10 ⁷	53	47

Tabella 15- Vitalità 37°C + Sali biliari a pH 2 dei ceppi *Saccharomyces* isolati da Skizo

Ceppi <i>Saccharomyces</i> da Skizo	Terreno YNB			Terreno YNB + Sali biliari pH2		
	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
S. Sc1	1.3*10 ⁸	80	20	9.4*10 ⁷	50	50
S. Sc2	1.3*10 ⁸	77	23	8.1*10 ⁷	47	53
S. Sc3	1.4*10 ⁸	76	24	7.5*10 ⁷	48	52
S. Sc4	1. *10 ⁸	90	10	9.4*10 ⁷	46	54
S. Sc5	1.6*10 ⁸	84	16	1.1*10 ⁸	56	44
S. Sc6	1.8*10 ⁸	83	17	1.1*10 ⁸	55	45
S. Sc7	1.8*10 ⁸	85	15	1.0*10 ⁸	54	46
S. Sc8	1.6*10 ⁸	78	22	9.1*10 ⁷	63	37
S. Sc9	1.8*10 ⁸	74	26	1.3*10 ⁸	61	39
S. Sc10	1.8*10 ⁸	73	27	1.3*10 ⁸	49	51
S. Sc11	1.1*10 ⁸	81	19	1.1*10 ⁸	45	55
S. Sc12	1.8*10 ⁸	83	17	1.3*10 ⁸	44	56
S. Sc13	1.3*10 ⁸	74	26	8.1*10 ⁷	41	59
S. Sc14	1.5*10 ⁸	75	25	6.3*10 ⁷	43	57
S. Sc15	1.2*10 ⁸	78	22	3.4*10 ⁷	46	54

Tabella 16- Vitalità 37°C + Sali biliari a pH 2 dei ceppi *Brettanomyces* isolati da Skizo

Ceppi <i>Brettanomyces</i> da Skizo	Terreno YNB			Terreno YNB + Sali biliari pH2		
	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
S. B1	9.7*10 ⁷	80	20	4.7*10 ⁷	36	64
S. B2	8.1*10 ⁷	81	19	3.1*10 ⁷	41	59
S. B3	8.4*10 ⁷	78	22	3.4*10 ⁷	45	55
S. B4	7.5*10 ⁷	76	24	5.0*10 ⁷	40	60
S. B5	7.8*10 ⁷	71	29	4.4*10 ⁷	36	64
S. B6	1.0*10 ⁸	83	17	5.9*10 ⁷	49	51
S. B7	7.8*10 ⁷	79	21	6.3*10 ⁷	45	55
S. B8	1.1*10 ⁸	84	16	5.0*10 ⁷	43	57
S. B9	1.0*10 ⁸	86	14	4.7*10 ⁷	41	59
S. B10	1.1*10 ⁸	81	19	8.1*10 ⁷	51	49
S. B11	7.8*10 ⁷	78	22	6.6*10 ⁷	52	48
S. B12	8.4*10 ⁷	76	24	6.9*10 ⁷	54	46
S. B13	9.1*10 ⁷	82	18	7.2*10 ⁷	48	52
S. B14	8.1*10 ⁷	77	23	5.9*10 ⁷	45	55
S. B15	8.8*10 ⁷	74	26	4.7*10 ⁷	55	45
S. B16	8.1*10 ⁷	85	15	4.7*10 ⁷	57	43
S. B17	9.1*10 ⁷	26	18	5.0*10 ⁷	51	49
S. B18	8.1*10 ⁷	69	31	7.2*10 ⁷	54	46

Tabella 17- Vitalità 37°C + Sali biliari a pH 2 dei ceppi *Candida* isolati da Skizo

Ceppi <i>Candida</i> da Skizo	Terreno YNB			Terreno YNB + Sali biliari pH2		
	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
S. C1	1.4*10 ⁸	80	20	1.2*10 ⁸	52	48
S. C2	1.4*10 ⁸	79	21	1.1*10 ⁸	55	45
S. C3	1.1*10 ⁸	75	25	8.4*10 ⁷	54	46
S. C4	1.1*10 ⁸	82	18	6.3*10 ⁷	55	45
S. C5	1.5*10 ⁸	81	19	7.2*10 ⁷	46	54
S. C6	1.2*10 ⁸	76	24	5.0*10 ⁷	44	56
S. C7	1.4*10 ⁸	80	20	6.9*10 ⁷	42	58
S. C8	1.3*10 ⁸	77	23	7.5*10 ⁷	56	44
S. C9	1.2*10 ⁸	83	17	9.1*10 ⁷	39	61
S. C10	1.5*10 ⁸	82	18	8.4*10 ⁷	68	32
S. C11	1.3*10 ⁸	80	20	9.7*10 ⁷	55	45
S. C12	1.3*10 ⁸	74	26	1.1*10 ⁸	54	46
S. C13	9.4*10 ⁸	86	14	7.2*10 ⁷	41	59
S. C14	1.1*10 ⁸	87	13	5.0*10 ⁷	45	55
S. C15	1.2*10 ⁸	78	22	5.9*10 ⁷	47	53

Tabella 18- Vitalità 37°C + Sali biliari a pH 2 dei ceppi *Saccharomyces* isolati da *Candida*

Ceppi <i>Saccharomyces</i> da <i>Candida</i>	Terreno YNB			Terreno YNB + Sali biliari pH2		
	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
C. Sc1	3.0*10 ⁸	80	20	1.3*10 ⁸	57	43
C. Sc2	2.8*10 ⁸	81	19	1.9*10 ⁸	66	34
C. Sc3	2.9*10 ⁸	81	19	1.4*10 ⁸	65	35
C. Sc4	3.0*10 ⁸	85	15	1.5*10 ⁸	71	29
C. Sc5	3.1*10 ⁸	88	12	1.6*10 ⁸	70	30
C. Sc6	2.9*10 ⁸	89	11	2.0*10 ⁸	74	26
C. Sc7	3.0*10 ⁸	86	14	1.6*10 ⁸	61	39
C. Sc8	2.7*10 ⁸	78	22	1.6*10 ⁸	55	45
C. Sc9	2.7*10 ⁸	89	11	1.9*10 ⁸	53	47
C. Sc10	2.9*10 ⁸	80	20	1.8*10 ⁸	59	41
C. Sc11	3.1*10 ⁸	86	14	1.8*10 ⁸	57	43
C. Sc12	2.8*10 ⁸	85	15	1.8*10 ⁸	63	37
C. Sc13	2.7*10 ⁸	90	10	1.3*10 ⁸	64	36
C. Sc14	2.8*10 ⁸	84	16	1.3*10 ⁸	61	39
C. Sc15	3.1*10 ⁸	82	18	2.0*10 ⁸	59	41

Tabella 19- Vitalità 37°C + Sali biliari a pH 2 dei ceppi *Brettanomyces* isolati da *Candida*

Ceppi <i>Brettanomyces</i> da <i>Candida</i>	Terreno YNB			Terreno YNB + Sali biliari pH2		
	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
C. B1	7.8*10 ⁷	81	19	8.8*10 ⁷	53	47
C. B2	1.1*10 ⁸	80	20	1.1*10 ⁷	47	53
C. B3	8.8*10 ⁷	79	21	1.1*10 ⁷	44	56
C. B4	7.2*10 ⁷	85	15	9.7*10 ⁷	55	45
C. B5	9.1*10 ⁷	80	20	1.0*10 ⁷	50	50
C. B6	6.9*10 ⁷	86	14	1.2*10 ⁷	57	43
C. B7	1.1*10 ⁸	79	21	7.8*10 ⁷	53	47
C. B8	8.1*10 ⁷	89	11	1.0*10 ⁷	48	52
C. B9	9.4*10 ⁷	88	12	1.1*10 ⁷	44	56
C. B10	1.3*10 ⁸	90	10	9.1*10 ⁷	51	49
C. B11	1.2*10 ⁸	89	11	1.1*10 ⁷	56	44
C. B12	9.7*10 ⁷	87	13	7.2*10 ⁷	68	32
C. B13	1.1*10 ⁸	78	22	1.1*10 ⁷	61	39
C. B14	9.4*10 ⁸	89	11	9.7*10 ⁷	59	41
C. B15	6.6*10 ⁷	75	25	8.8*10 ⁷	60	40
C. B16	1.3*10 ⁸	85	15	7.8*10 ⁷	48	52
C. B17	7.8*10 ⁷	84	16	7.2*10 ⁷	53	47
C. B18	7.8*10 ⁷	85	15	6.9*10 ⁷	55	45

Tabella 20- Vitalità 37°C + Sali biliari a pH 2 dei ceppi Candida isolati da Candida

Ceppi Candida da Candida	Terreno YNB			Terreno YNB + Sali biliari pH2		
	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte	Numero totale di cell (Cell/ml)	%cell Vive	%cell Morte
C. C1	6.9*10 ⁷	86	14	8.8*10 ⁷	65	35
C. C2	1.0*10 ⁸	86	14	9.1*10 ⁷	59	41
C. C3	8.8*10 ⁷	78	22	8.1*10 ⁷	54	46
C. C4	7.2*10 ⁷	81	19	1.0*10 ⁸	62	38
C. C5	6.3*10 ⁷	80	20	1.0*10 ⁸	57	43
C. C6	1.1*10 ⁸	84	16	1.2*10 ⁸	50	50
C. C7	1.1*10 ⁸	79	21	6.9*10 ⁷	47	53
C. C8	8.1*10 ⁸	89	11	1.1*10 ⁸	44	56
C. C9	1.3*10 ⁸	79	21	6.6*10 ⁸	55	45
C. C10	8.8*10 ⁸	79	21	7.2*10 ⁷	51	49
C. C11	8.8*10 ⁸	89	11	1.1*10 ⁸	53	47
C. C12	1.2*10 ⁸	87	13	8.4*10 ⁸	68	32
C. C13	1.3*10 ⁸	82	18	1.1*10 ⁸	61	39
C. C14	1.1*10 ⁸	80	20	9.1*10 ⁸	74	26
C. C15	1.2*10 ⁸	89	11	6.6*10 ⁸	63	37

4.2.3 Attività antiossidante della matrice

L'attività antiossidante è stata testata grazie ad il saggio con DPPH. La prova permette di determinare il potere antiossidante mediante il potenziale di riduzione del radicale chimico DPPH attraverso il trasferimento di un idrogeno. Il DPPH inizialmente di colore viola si riduce a DPPH-H virando in un giallo pallido. Sono stati letti mediante spettrofotometria i campioni in doppio di ogni birra, e attraverso la formula:

$$[1 - (\text{ABS campione} / \text{ABS bianco})] \times 100$$

si è calcolata la percentuale di inibizione del DPPH.

Si è riscontrata un'ottima inibizione del radicale da parte di tutte e tre le birre, in particolar modo la birra "Skizo" arriva ad un 86,1% d'inibizione, mentre rispettivamente: "Flora" 83,4% e "Candida" 85,7%.

Tabella 21- Attività inibizione DPPH della matrice di birra. Sono riportati i valori medi e deviazione standard.

Campione	% Attività antiossidante
Flora	83.4±0.13
Candida	85.7±0.16
Skizo	86.1±0.15

4.3 PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI

I dati relativi ai principali composti secondari delle fermentazioni condotte sulle birre Skizo, Flora e Candida, sono riportate nella tabella 22. Per quanto riguarda il contenuto di acetaldeide il campione che ha mostrato un contenuto significativamente più alto è stato quello del campione Candida.

Tabella 22- Principali composti secondari I dati sono media \pm DS. I valori che mostrano

	ACETALDEIDE (mg/L)	ETIL ACETATO (mg/L)	PROPANOLO (mg/L)	ISOBUTANOLO (mg/L)	AMILICO ATTIVO (mg/L)	ISOAMILICO (mg/L)
SKIZO	0.91 \pm 0.07 ^c	6.69 \pm 0.07 ^c	13.59 \pm 0.41 ^c	9.21 \pm 0.054 ^b	1.85 \pm 0.15 ^c	27.43 \pm 0.15 ^a
FLORA	1.13 \pm 0.09 ^b	23.54 \pm 0.98 ^a	23.422 \pm 0.20 ^a	24.26 \pm 0.68 ^{ab}	4.47 \pm 0.26 ^a	35.55 \pm 0.14 ^b
CANDIDA	1.28 \pm 0.03 ^a	17.19 \pm 0.36 ^b	21.92 \pm 0.05 ^b	16.01 \pm 0.56 ^a	2.75 \pm 0.18 ^b	27.27 \pm 0.84 ^a

differenti lettere (^{a, b, c}) all'interno di ogni colonna, indicano significative differenze in accordo con il test di Duncan (0,05%)

Relativamente all'etilacetato (odore di solvente), troviamo la concentrazione significativamente minore nel campione della birra "Skizo" (6.69mg/L), mentre rispettivamente nelle birre "Flora" troviamo delle concentrazioni significativamente più alte. Anche per quanto riguarda la concentrazione di propanolo (retrogusto dolciastro, rafforza aroma alcolico) troviamo nella birra "Skizo" la concentrazione significativamente più bassa (13.59 mg/L), infatti al gusto è quella che risulta più fresca e leggera delle tre. L'amilico attivo (nota fruttata) ha un valore più alto nella birra "Flora" (4.47mg/L), mentre diminuisce nella "Candida" (2.75 mg/L) ed ancora nella "Skizo" (1.85mg/L). Per quanto riguarda la concentrazione di isoamilico (aroma alcolico-fruttato), che la birra flora è quella che ha evidenziato un contenuto di tale composto significativamente più alto.

4.4 PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI

Le concentrazioni dei principali composti volatili che sono stati analizzati nelle birre sono riportati nella tabella 23. Proprio come si evince dalla tabella tutte e tre le birre hanno concentrazioni paragonabili tra loro per etilottanoato, linalool, dietilsuccinato, nerolo, geraniolo e β -damascenone.

L'etilbutirrato (aroma di mela) ed etilesanoato ()nel campione di Flora risulta con una concentrazione significativamente più alta, l' acetato di isoamile invece è più presente nel campione della birra Candida. Il feniletacetato ha una concentrazione maggiore nel campione di Skizo, mentre negli altri due ha concentrazioni molto basse. Il β -feniletanoato rispetto a tutti gli altri composti possiede una concentrazione più elevata, nei campioni Candida e Skizo ha una concentrazione paragonabile, mentre nel campione di Flora risulta significativamente più bassa.

Tabella 23- Principali composti volatili delle birre analizzate. Concentrazione composti volatili determinati con tecnica SPME. I dati sono media \pm DS. I valori che mostrano differenti lettere (^{a, b, c}) all'interno di ogni colonna, indicano significative differenze in accordo con il test di Duncan (0,05%)

	etilbutirrato	acetato di isoamile	etilesanoato	etilottanoato	linalolo	dietilsuccinato	feniletilacetato	nerolo	geraniolo	β -feniletanolo	β -damascenone
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
CANDIDA	0.21 \pm 0.03 ^b	2.11 \pm 0.12 ^a	0.66 \pm 0.04 ^{ab}	0.001 \pm 0.000 ^b	0.04 \pm 0.002 ^a	0.015 \pm 0.001 ^a	0.07 \pm 0.001 ^b	0.01 \pm 0.002 ^a	0.01 \pm 0.001 ^a	45.2 \pm 0.63 ^a	0.001 \pm 0.002 ^a
SKIZO	0.15 \pm 0.03 ^b	0.31 \pm 0.08 ^b	0.23 \pm 0.01 ^b	0.004 \pm 0.000 ^a	0.05 \pm 0.002 ^a	0.02 \pm 0.003 ^a	0.25 \pm 0.03 ^a	0.02 \pm 0.001 ^{aa}	0.03 \pm 0.001 ^a	53.4 \pm 0.60 ^a	0.007 \pm 0.003 ^a
FLORA	0.42 \pm 0.27 ^a	0.951 \pm 0.00 ^c	0.81 \pm 0.04 ^a	0.002 \pm 0.000 ^b	0.028 \pm 0.001 ^a	0.016 \pm 0.001 ^a	0.05 \pm 0.004 ^b	0.01 \pm 0.001 ^a	0.01 \pm 0.004 ^b	25.6 \pm 0.26 ^b	0.002 \pm 0.002 ^a

CAPITOLO 5 – DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Il mercato degli alimenti funzionali è cresciuto rapidamente negli ultimi anni, grazie all'aumento della richiesta da parte dei consumatori, sempre più interessati al proprio benessere e al miglioramento della propria salute (Carrillo et al, 2013). Ciò ha rivoluzionato il mercato alimentare promuovendo la commercializzazione di prodotti innovativi e che apportino benefici nutrizionali specifici. Tra questi vi sono ad esempio le bevande funzionali, come kombucha, tè, estratti di frutta e verdura in grado di apportare benefici alla salute del consumatore (Kim et al., 2019). Recentemente sono i probiotici a dominare il mercato tra le varie categorie di alimenti funzionali. L'arricchimento dei prodotti con i probiotici, infatti, se aggiunti in adeguate quantità, forniscono numerosi effetti positivi per l'ospite tra cui regolare l'equilibrio microbico intestinale, la modulazione immunitaria e ridurre l'infiammazione di malattie intestinali (Kaur et al, 2002). Per questa ragione la ricerca si sta sempre più focalizzando sulla selezione di microrganismi da applicare nel campo alimentare.

Per questo motivo, in questo lavoro di tesi, tutte le prove ed analisi effettuate hanno avuto lo scopo di caratterizzare analiticamente tre birre del birrifico artigianale “La casa di cura” per valutare la presenza di lieviti probiotici/funzionali o la funzionalità della bevanda stessa.

Nelle birre analizzate sono stati isolati vari generi di lievito come *Saccharomyces*, *Candida* e *Brettanomyces*. dai dati ricavati si può notare che dopo 24h, in presenza di sali biliari, la vitalità diminuisce uniformemente di tutti i ceppi isolati, confrontando i risultati ottenuti con la letteratura scientifica (Amorim et al, 2018) si è riscontrata una vitalità inferiore dei ceppi isolati dalle 3 birre probiotiche Flora, Skizo e Candida (una media del 50% delle cellule sono morte), con nessun ceppo di lievito che si è distinto per una particolare resistenza, mentre nella bibliografia la percentuale di cellule morte è bassa, intorno al 10%.

Riguardo all'attività antiossidante delle birre testate, I risultati ottenuti sono molto incoraggianti, infatti in tutti i campioni si ha un'inibizione di più dell'80% del radicale, dimostrando la presenza di sostanze antiossidanti nella birra. Inoltre, i risultati ottenuti sono in linea con quelli riportati da Pereira et al, 2020, dove le birre arricchite con *S. cerevisiae var boulardii* presentavano una capacità antiossidante di circa il 70%.

per quanto riguarda invece la componente volatile e gli alcoli superiori si è potuto appurare come la produzione artigianale porti ad un prodotto finale estremamente complesso. Ogni birra analizzata possiede un peculiare profilo aromatico, le concentrazioni di composti secondari come l'etilacetato e di composti volatili come, ad esempio, l'acetato d'isoamile (aroma di banana), hanno concentrazioni in linea con la letteratura scientifica (Canonico et al., 2014). Il campione della birra Skizo possiede un valore di acetato di isoamile più elevato della media, mentre quello del β -feniletanolo (aroma fruttato) è molto paragonabile tra le birre Candida e Skizo, mentre rimane più basso nella birra Flora, ma in tutti e tre i campioni rimaniamo a concentrazioni minori rispetto a quelle riportate in letteratura.

L'utilizzo di specie di lievito derivanti da bevande ricche di probiotici, come nel nostro caso il kombucha, hanno dato dei risultati incoraggianti, soprattutto per la loro capacità antiossidante. La birra, in questo modo, non viene più considerata come una semplice bevanda da compagnia ma anche come un prodotto arricchito con specifiche proprietà benefiche e varietà aromatica.

CAPITOLO 6. BIBLIOGRAFIA

- Amorim J C, Piccoli R H, Duarte W F, (2018). Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. *Food Research International*, Vol 107, 518–527.
- Briggs DE, Sole SM, Latham P. (2009). Tetrazolium Staining, Mitochondria, and Barley Quality. *Journal of the Institute of Brewing* 115, 41-48.
- Bokulich NA, Bamforth CW, (2013) The microbiology of malting end brewing *microbiol mol boil rev.* 77(2)
- Cabras P, Martelli A, (2004). *Chimica degli alimenti*. Piccin Editore
- Canonico L, Comitini F, Ciani M, (2014) Dominance and influence of selected *Saccharomyces cerevisiae* strains on the analytical profile of craft beer refermentation. *Institute of Brewing & Distilling*.
- Carrillo E, Prado-Gascó V, Fiszman S, Varela P, (2013). Why buying functional foods? Understanding spending behaviour through structural equation modelling. *Food Research International*
- Di Lodovico S, Menghini L, Ferrante C, Recchia E, Castro-Amorim J, Gameiro P, Bessa LJ, (2020) Hop Extract: An Efficacious Antimicrobial and

Anti-biofilm Agent Against Multidrug-Resistant *staphylococci* Strains and *Cutibacterium acnes*. *Frontiers in Microbiology*, Vol.11.

- Ferraro PM, Taylor EN, Gambaro G, Curhan GC, (2013) Soda and other beverages and the risk of kidney stones. *Clin J Am Soc Nephrol* Vol.(8):1389-95.
- Gonzalez VC, Fuentes S, Torrico DD, Godbole A, Dunshea FR, (2019) Chemical characterization of aromas in beer and their effect on consumers liking. *Food Chem* Vol.293:479-485. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.04.114
- Granato D, Barba FJ, Bursac D, Kovačević JM, Cruz AG, Putnik P, (2020) Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annu Rev Food Sci Technol* Vol.11:93-118.
- Holt S, Miks MH, de Carvalho BT, Foulquié-Moreno MR, Thevelein JM, (2019) The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. *FEMS Microbiol Rev.*Vol.43(3):193-222.
-
- Kaźmierczak-Siedlecka K, Ruszkowski J, Fic M, Folwarski M, Makarewicz W, (2020) *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745: A Non-bacterial Microorganism Used as Probiotic Agent in Supporting Treatment of Selected Diseases. *Curr Microbiol* Vol.77(9):1987-1996.
- Kaur IP, Chopra K, Saini A, (2002) Probiotics: Potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.*Vol.15, 1–9
- Kim SK, Guevarra RB, Kim YT, Kwon J, Kim H, Cho JH, Kim HB, Lee JH, (2019) Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. *J Microbiol Biotechnol.* Vol. (9):1335-1340.

- Lodolo E J, Kock J L F, Axcell B C, Brooks M. (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* the main character in beer brewing. FEMS Yeast Research, 8(7), 1018–1036.
- Manzoni M, (2006). Microbiologia industrial. Editore: casa editrice ambrosiana
- Moré MI, Swidsinski A, (2015) *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis – a review. Vol.8:237-255
- Pereira R P, Jadhav R, Baghela A, Barretto D A, (2021). In Vitro Assessment of Probiotic Potential of *Saccharomyces Cerevisiae* DABRP5 Isolated from Bollo Batter, a Traditional Goan Fermented Food. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 13(3), 796–808.
- Pires E, Teixeira J, Brányik T, Vicente A, (2014) Yeast: The soul of beer’s aroma – A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. Applied microbiology and biotechnology Vol. 98.
- Rabin D, Forget C, (1998). The dictionary of beer and brewing. Taylor & Francis
- Reuter G, (2001) The Lactobacillus and Bifidobacterium microflora of the human intestine: composition and succession. Curr Issues Intest Microbiol. Vol. (2):43-53. PMID: 11721280.
- Ritchie ML, Romanuk TN, (2012) A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. PLoS One. Vol.7(4):e34938.

- Smith BD, (2016) *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages, in Food Microbiology, Vol.59.
- Stewart I. (2009). Brewer's Yeast: An Introduction to Brewing Science and Technology, 2 ed. The Institute of Brewing, London.
- Tuli HS, Aggarwal V, Parashar G, Aggarwal D, Parashar NC, Tuorkey MJ, Varol M, Sak K, Kumar M, Buttar HS, (2022) Xanthohumol: A Metabolite with Promising Anti-Neoplastic Potential Anticancer Agents MedChem. (2022) Vol. (3):418-432.
- Zhang SM, Willett WC, Selhub J, Hunter DJ, Giovannucci EL, Holmes MD, Colditz GA, Hankinson SE, (2003) Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, homocysteine, and risk of breast cancer. J Natl Cancer Inst Vol.95(5):373-80.